



Biotecnia

Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud editada por la Universidad de Sonora



indexada en

latindex

IC Journal
Master List

e-revist@s

PERIÓDICA
ÍNDICE DE REVISTAS LATINOAMERICANAS EN CIENCIAS

THOMSON REUTERS

Miembro de

Crossref

Pertenece al Sistema de Clasificación de Revistas Mexicanas de Ciencia y Tecnología del CONACYT



<http://biotecnia.unison.mx>

BIOTECNIA, 2021, 23, Número 1 (enero – abril), es una publicación electrónica cuatrimestral editada por la Universidad de Sonora, a través de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, con domicilio en Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col Centro, Hermosillo, Sonora, México, C.P.83000, página web: <https://www.biotecnia.unison.mx>, correo-e: biotecnia.difusion@unison.mx. Editor responsable del número: Enrique Márquez Ríos.

Reserva de Derechos al Uso Exclusivo 004-2022-061515171200-102. ISSN: 1665-1456; ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación. Se autoriza la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes en la presente publicación, siempre y cuando se cuente con la autorización del editor y se cite plenamente la fuente.



La revista Biotecnia se encuentra bajo la licencia Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)

Contenido

Tipo	Páginas	Artículo
Original	pp 5-13	Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación in vitro de <i>Vanilla planifolia</i> Jacks. ex Andrews (<i>Orchidaceae</i>)
Original	pp 14-21	Evaluación del efecto de los SNPs G530A (calpaína), C357G (calpastatina), G1795A (miopaldina) y G1181A (PPARGC1A) sobre la terneza de carne bovina de una región del Estado de Veracruz, México
Original	pp 22-29	Caracterización y selección de levaduras nativas aisladas de la fermentación natural de la producción artesanal de la bebida bacanora
Original	pp 30-37	Efecto del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> A. Gray sobre aislados clínicos de <i>Candida glabrata</i>
Original	pp 38-44	Influencia del nivel nutricional sobre la calidad seminal y el comportamiento sexual de los machos cabríos tratados con días largos artificiales
Original	pp 45-49	Rentabilidad y rendimiento de girasol en función del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante
Original	pp 50-57	Efecto de la adición de subproductos agroindustriales en las propiedades físicas de un biopolímero almidón-gelatina
Original	pp 58-65	Cocción tradicional con especias de <i>Phaseolus vulgaris</i> L. y su efecto antinutricional e inhibición bacteriana
Revisión	pp 66-77	Actividad de extractos de plantas y hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (<i>Conotrachelus dimidiatus</i> Champion) Coleóptera: <i>Curculionidae</i>
Original	pp 78-88	Agricultura con riego por goteo de agua de mar para la producción de <i>Salicornia</i> en Tierra del Fuego, Argentina
Original	pp 89-100	Efecto del periodo seco en cabras bajo condiciones de pastoreo, en el volumen y cantidad de compuestos lácteos subsecuente
Original	pp 101-108	Efecto de termosonicación y pasteurización sobre propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y nutracéuticas en bebidas de maíz

- Original pp 109-116 Soluciones hidratantes en dos cultivares de nardo (*Polianthes tuberosa*): respuestas físicas, fisiológicas y bioquímicas
- Original pp 117-124 Efecto de diferentes proporciones de luz LED azul:roja en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)
- Original pp 125-132 Caracterización tecno-funcional de un concentrado proteínico obtenido de la semilla de mango (*Mangifera indica* L.)
- Original pp 133-141 Antagonismo micoparasítico de una cepa de *Trichoderma harzianum* aislada de plantas de plátano en Oaxaca, México
- Original pp 142-150 Efecto de la adición de cáscara y semilla deshidratada en la capacidad antioxidante de una pasta de tomate producida en Sinaloa
- Original pp 151-157 Elaboración de papel como uso potencial de fibras a partir de desechos de *Opuntia ficus-indica*
- Original pp 158-166 Uso de hidrólisis previa a la modificación química y termomecánica de almidón de arroz: alternativa a las modificaciones tradicionales
- Original pp 167-174 Hidrolizados enzimáticos con actividad antioxidante y antihipertensiva obtenidos del concentrado proteico del suero lácteo bovino

Efecto de extractos orgánicos naturales sobre la micropropagación de *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae)

Effect of natural extracts on the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews (Orchidaceae)

Candy Carranza-Álvarez^{1*}, Karina Lizbeth Trinidad-García², Humberto Reyes-Hernández³, Luis Jesús Castillo-Pérez², Javier Fortanelli-Martínez⁴

¹ Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Ciudad Valles, S.L.P., México.

² Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México.

³ Facultad de Ciencias Sociales y Humanidades, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México.

⁴ Instituto de Investigaciones de Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México.

RESUMEN

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews es una orquídea de gran importancia económica, que presenta problemas de sobreexplotación y amenaza en su hábitat original. Por lo cual, el objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo de micropropagación *in vitro* evaluando el efecto de diferentes extractos orgánicos. El cultivo *in vitro* se inició a través de la germinación de semillas que dieron lugar a la formación de protocormos. Los protocormos se cultivaron en medios MS suplementados con extractos naturales: MPL (plátano), MPI (piña), MCO (agua de coco) y medio control, para promover la morfogénesis. Posteriormente, para inducir la rizogénesis de los brotes y la aclimatación, se utilizaron tratamientos con auxinas (AIA y AIB). Los resultados mostraron que la germinación inició a los 60 días de cultivo *in vitro*, y que la adición de los extractos orgánicos promovió la diferenciación de los brotes, resultando más eficiente el tratamiento MPI. Además, la adición de 0.5 mg L⁻¹ de AIA promovió el enraizamiento y la pre aclimatación *in vitro*. Estos resultados sugieren que los extractos orgánicos promueven la morfogénesis de vainilla, sin necesidad de emplear reguladores de crecimiento sintéticos en las primeras etapas de la micropropagación *in vitro*.

Palabras-clave: Vainilla, micropropagación, extractos naturales.

ABSTRACT

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews is an orchid of great economic importance, which faces problems due to overexploitation and threat of its original habitat. Therefore, the aim of the present investigation was to establish an *in vitro* micropropagation protocol evaluating the effect of different organic extracts.

The first stage of the *in vitro* culture was the seeds germination leading to the formation of protocorms. The protocorms were grown in MS media supplemented with natural extracts: MPL (banana), MPI (pineapple), MCO (coconut water) and control medium, to promote morphogenesis. Subsequently, to induce shoots rhizogenesis and acclimatization, auxin treatments (AIA and AIB) were used. The results

showed that *in vitro* germination began at 60 days, and that the addition of organic extracts promoted the differentiation of the shoots, resulting the MPI treatment more efficient. Furthermore, the addition of 0.5 mg L⁻¹ of IAA promoted *in vitro* plants rooting and pre-acclimatization. These results suggest that organic extracts promote the vanilla morphogenesis, without synthetic growth regulators in the early stages of *in vitro* micropropagation.

Keyword: vanilla, micropropagation, natural extracts.

INTRODUCCIÓN

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews es una planta hemiepífita o terrestre de la familia Orchidaceae, de clima cálido, que se desarrolla en condiciones de luz y sombra bajo temperaturas de entre 20 y 30 °C, y para su desarrollo necesita un sostén (otra planta o un árbol, la cual es llamada tutor) (Hernández-Hernández, 2011). Su ciclo de vida inicia a los dos años de crecimiento vegetativo, y durante el tercer año inicia la producción de las vainas de donde se obtiene la esencia comercial mundialmente conocida como vainilla (Kelso-Bucio *et al.*, 2012).

Esta planta posee su centro de origen en México, siendo los principales productores de vainilla los estados de Veracruz, Oaxaca, Puebla y San Luis Potosí (Luna-Guevara *et al.*, 2016). En San Luis Potosí, los municipios con mayor producción de vainilla son Axtla de Terrazas, Tamazunchale, Aquismón, Matlapa, Coxcatlán, Huehuetlán y Xilitla, situados en la Huasteca Potosina, los cuales han desarrollado sistemas de cultivo y producción de vainilla tradicionales (Vargas-Hernández y Gámez-Vázquez, 2014; Reyes-Hernández *et al.*, 2018).

Actualmente, la vainilla se considera una especie amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2010), debido a la sobreexplotación, lo que ha reducido las poblaciones silvestres y mermado la diversidad genética (Soto-Arenas 1999; SAGARPA, 2010). Además, la propagación de la vainilla se encuentra limitada por problemas naturales como la reducida viabilidad de las semillas y las bajas tasas de germinación (Soto-Arenas 2006; Torres-González *et al.*, 2011). Por esta razón, se propaga

*Autor para correspondencia: Candy Carranza-Álvarez
Correo electrónico: candy.carranza@uaslp.mx

Recibido: 13 de agosto de 2020

Aceptado: 22 de octubre de 2020

asexualmente, sin embargo, este método no garantiza la calidad de las nuevas plantaciones, y se limita a un pequeño número de esquejes por planta donante. Esta problemática afecta principalmente a los productores que dependen de este cultivo tradicional, por lo que es importante establecer alternativas que contribuyan no sólo al rescate de la especie vegetal, sino también a crear metodologías de propagación que garanticen la disponibilidad de material para solucionar las necesidades de los distintos sectores de interés (Flores-Castaños *et al.*, 2017).

En este sentido, el cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica útil para producir una gran cantidad de plantas en un tiempo relativamente corto, con calidad y rendimiento uniforme, con independencia de las variaciones geográficas, estacionales y ambientales, y sin uso de pesticidas y/o herbicidas (Rao y Ravishankar, 2002; Debnath, 2009; Espinosa-Leal *et al.*, 2018). En la actualidad, mediante el CTV es posible micropropagar especies con problemas de conservación como las orquídeas (Gaudencio-Sedano *et al.*, 2015). La micropropagación de orquídeas es una herramienta del CTV indispensable para la propagación *in vitro* de semillas y clones, especialmente con fines comerciales (Thammasiri *et al.*, 2020).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue establecer un protocolo de regeneración *in vitro* de *V. planifolia* a través del uso de extractos orgánicos naturales (agua de coco, jugo de piña y pulpa de plátano), para garantizar la producción de plántulas de vainilla de manera orgánica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los especímenes de *V. planifolia* fueron recolectados en la comunidad de Cuichapa, Matlapa, San Luis Potosí, México (coordenadas: 21°19'4.00" LN y 98°49'33.99" LW), y proporcionados por el Centro de Acopio y beneficiado de vainilla, palmilla, café, piloncillo y derivados GANCA, S.P.R de R.L. (Grupo Antonio Calderón). Las plantas fueron colocadas en maceta con tierra de jardín, y adaptadas en condiciones de invernadero (25 °C y 70 % de humedad). La polinización de estas plantas se realizó de forma manual siguiendo la metodología establecida por Menchaca-García (2011). Para inducir la germinación de las semillas se utilizó el medio basal con vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962; Phyto Technology Laboratories, LLC., Lenexa, Kansas) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 5.0 g L⁻¹ de carbón activado (Karat S.A. de C.V, León, México) y 8 g L⁻¹ de agar (Phyto Technology Laboratories, LLC., Lenexa, Kansas, Shawnee Mission, Kansas; Plant Tissue Culture grade).

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 y se esterilizaron a 120 °C por 20 minutos (1.37×10⁵ Pa). Los cultivos se mantuvieron a 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz a 45 µmol m⁻² s⁻¹ y 8 horas de oscuridad, la luz fue suministrada con lámparas fluorescentes blanco frío (Phillips, Saltillo, México).

Asepsia de la cápsula y protocolo de germinación

En el presente trabajo, la micropropagación *in vitro* se realizó utilizando semillas inmaduras de *V. planifolia* provenientes de frutos de 15 cm de longitud, obtenidos por polinización artificial en condiciones de cultivo de malla-sombra.

Las cápsulas de *V. planifolia* antes de la dehiscencia fueron desinfectadas de forma superficial con jabón antibacterial al 40 % por 20 min, AgNO₃ al 10 % por 15 minutos, etanol al 70 % por 2 min, con hipoclorito de sodio al 10 % y tres gotas de Tween® 80 en 100 mL de agua durante 10 min. Finalmente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron cultivadas para germinar en medio MS basal adicionado con 5 % (p/v) de carbón activado (Karat S.A. de C.V, León, México) sin reguladores de crecimiento vegetal.

Los medios de cultivo con las semillas inoculadas se mantuvieron en oscuridad por cuatro semanas dentro del cuarto de cultivo del Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la U.A.S.L.P., a una temperatura de 25 °C, y posteriormente otras cuatro semanas con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, la luz fue suministrada con lámparas fluorescentes blanco frío (Phillips, Saltillo, México).

Inducción de brotes a partir de protocormos

Para inducir el desarrollo de brotes, se utilizaron protocormos de 16 semanas de edad. Las vitroplantas se cultivaron en medio MS con 15 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 % de carbón activado, 8 g L⁻¹ de agar phytigel (Phyto Technology, Shawnee Mission, KS; Plant Tissue Culture grade), y se suplementaron con extractos orgánicos naturales, resultando las siguientes combinaciones: medio MS sin extractos (control), medio MS con 10 g L⁻¹ de extracto de piña (MPI), medio MS con 10 g L⁻¹ de extracto de plátano (MPL) y medio MS con 30 mL L⁻¹ de agua de coco (MCO). Los sustratos naturales utilizados fueron obtenidos de Phyto Technology Laboratories.

El pH de los medios se ajustó a 5.7 con NaOH 1N y/o HCl 1N. Los protocormos se sembraron en estos medios de cultivo durante 60 días, y se mantuvieron a 25 °C con un fotoperiodo de 16 h de luz a 45 µmol m⁻² s⁻¹ y 8 horas de oscuridad, la luz fue suministrada con lámparas fluorescentes blanco frío (Phillips, Saltillo, México). Se realizaron evaluaciones mensuales del número y altura de los brotes nuevos producidos.

Enraizamiento de los brotes

Los brotes de *V. planifolia* mayores a 4 cm se retiraron del medio de cultivo, se enjuagaron en agua destilada estéril para eliminar por completo los restos del medio de cultivo, y se sembraron en recipientes de vidrio de 100 mL con diferentes tratamientos para inducir la formación de la raíz. Los tratamientos fueron los siguientes: i) medio MS basal (Tratamiento Control); ii) medio MS con 10 g L⁻¹ de extracto de piña más 1 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP) más 0.5 mg L⁻¹ de AIA (Tratamiento 0.5 AIA) y iii) medio MS con 10 g L⁻¹ de extracto de piña más 1 mg L⁻¹ 6-bencilaminopurina (BAP) más 1.0 mg L⁻¹ de AIA (Tratamiento 1.0 AIA). Los diferentes tratamientos se preservaron en condiciones del cuarto de

cultivo, y se registró el número y la longitud de raíces, y el porcentaje de oxidación durante 60 días.

Preaclimatación *in vitro*

Las plántulas de *V. planifolia* mayores a 6 cm y con mayor número y longitud de raíces se retiraron de los medios de cultivo, se enjuagaron en agua destilada estéril, y se sometieron a un proceso de pre aclimatación *in vitro*, para lo cual se sembraron en frascos de vidrio con capacidad de 500 mL con diferentes tratamientos: i) suelo orgánica estéril (control), ii) suelo orgánico estéril con 1.0 mg L⁻¹ de AIA (Tratamiento TAlA1.0) y iii) suelo orgánico estéril con 2.0 mg L⁻¹ de AIA (Tratamiento TAlA2.0). Las vitroplantas se preservaron en condiciones del cuarto de cultivo, y se registró la longitud, el número de hojas, el porcentaje de oxidación y el porcentaje de contaminación semanalmente durante 41 días de cultivo.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para comparar los tratamientos. En cada tratamiento evaluado se establecieron 10 frascos como repetición, en cada frasco se sembraron cinco vitroplantas, para un total de 50 vitroplantas por tratamiento. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Su desarrollo en cada tratamiento fue evaluado mensualmente. Se registraron tres variables en la primera etapa de inducción de brotes (número de brotes, altura de los brotes, formación de yemas), en la segunda etapa denominada enraizamiento se registraron dos variables (número de raíces y longitud de raíces), y en la última etapa denominada pre aclimatación se evaluaron dos variables adicionales (altura de las plantas y formación de hojas nuevas).

Todos los datos fueron registrados como media \pm error estándar de la media (SEM). Posteriormente, para cada variable se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía tipo modelo lineal general (MLG), verificando previamente los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas (prueba de Levene). Adicionalmente, se utilizó la prueba de Tukey ($p < 0.05$) para comparar las medias entre los diferentes tratamientos. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistic para Windows, versión 8.0.

RESULTADOS

Germinación de las semillas

La germinación asimbiótica de las semillas de *V. planifolia* se logró a los 90 días de cultivo *in vitro*, en donde se observó un porcentaje de germinación mayor al 90 % (Figura 1). La germinación se indujo al colocar las semillas en la oscuridad durante los primeros 30 días. Posterior a los 60 días de cultivo, se observó un hinchamiento y cambio de coloración de las semillas, que culminó con la formación de protocormos (PLB's: Protocorm Like Bodies) a los 90 días (Figura 2A).

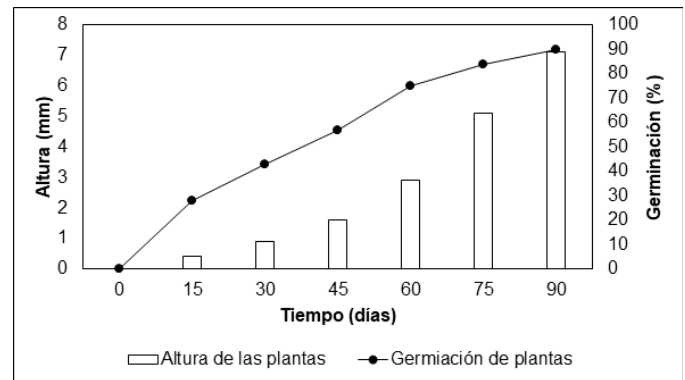


Figura 1. Germinación de semillas y crecimiento de plántulas de *V. planifolia*. Las semillas germinaron en medio MS basal adicionado con 1 % (p/v) de carbón activado.

Figure 1. Seed germination and seedling growth of *V. planifolia*. Seeds germinated in basal MS medium added with 1 % (w/v) of activated charcoal.

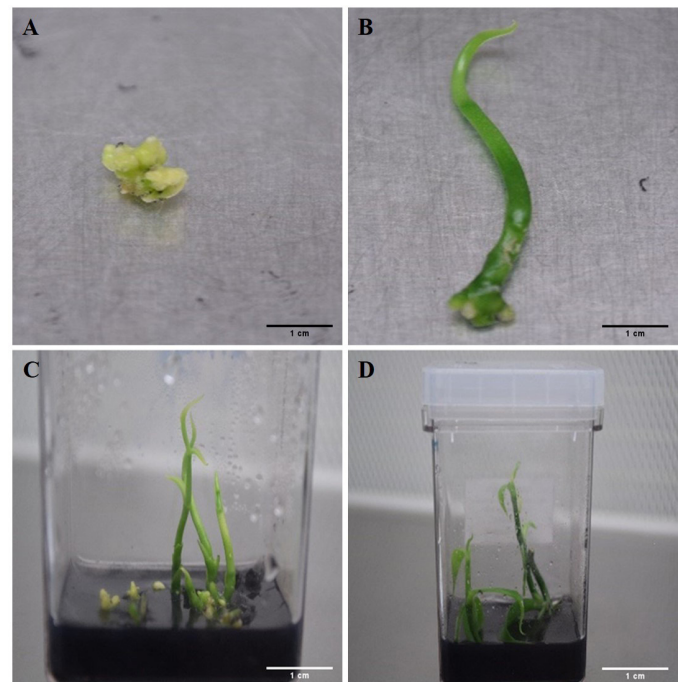


Figura 2. Desarrollo morfológico de *V. planifolia*. (A) Protocormo; (B) Formación de brote a partir de protocormo; (C) Aparición de yemas en los brotes; (D), Formación de raíces y hojas. Barra 1 cm.

Figure 2. Morphological development of *V. planifolia*. (A) Protocorm; (B) Outbreak formation from protocorm; (C) Bud appearance; (D), Roots and leaves formation. Bar 1 cm.

Efecto de sustratos naturales sobre la formación de brotes a partir de protocormos

Una vez formados los protocormos de *V. planifolia*, se observó el crecimiento de pequeños brotes apicales de color verde oscuro a los 28 días de cultivo, como resultado del cultivo de éstos en los tratamientos con diferentes sustratos orgánicos. El porcentaje de respuesta fue dependiente del tratamiento empleado. Se observó un 100 %, 93.4 %, 33.5 % y 33 % de respuesta en los MCO, MPI, MPL y control, respectivamente.

La formación de brotes definidos se presentó hasta los 120 días de cultivo, después de dos subcultivos realizados cada 60 días (Figura 2B). Se consideraron brotes definidos, aquellos que presentaron al menos una yema con dos hojas. El tratamiento suplementado con extracto de piña (MPI) fue en donde se observó la mayor producción de brotes (5.7 ± 3.5), resultado significativamente diferente con respecto al control. El tratamiento MCO produjo 4.6 ± 2.7 brotes, seguido del control (4.6 ± 3.3 brotes) y el tratamiento con extracto de plátano (MPL) el cual produjo 4.2 ± 2.7 brotes. Los tratamientos MCO y MPL no mostraron diferencia estadística significativa, respecto al control (Figura 3A).

En relación con la altura de los brotes, se observó un mayor incremento en los tratamientos MPI y MCO, cuyas alturas oscilaron entre 36.9 ± 17.3 y 35.1 ± 18.8 mm respectivamente, resultados estadísticamente significativos respecto al

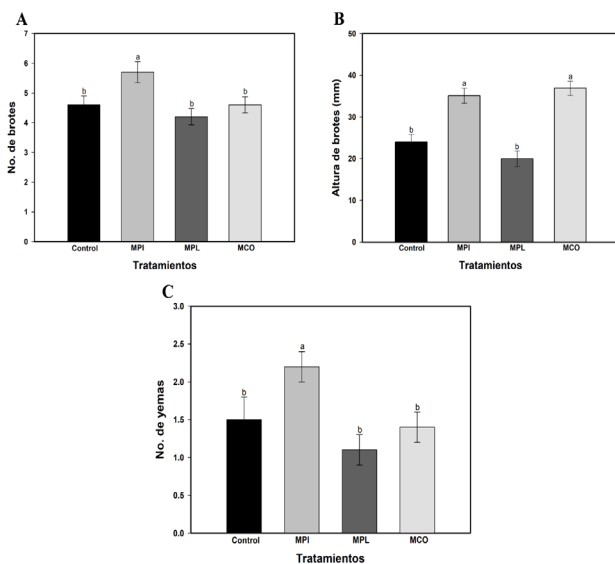


Figura 3. Respuesta de las vitroplantas de *V. planifolia* a la adición de EO. (A) Producción media del número de brotes; (B) Altura media de los brotes producidos; (C) Producción media del número de yemas. Las barras de error representan el error estándar de las concentraciones ($n = 50$). Las medias con diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) de acuerdo con el análisis de Tukey.

Extractos orgánicos: MPI (piña); MPL (plátano); MCO (agua de coco).

Figure 3. *V. planifolia* vitroplants response to OE addition. (A) Average production of shoots; (B) Average height of shoots produced; (C) Average production of buds. Error bars represent the standard error of the concentrations ($n = 50$). Means with different letters show significant differences ($p < 0.05$) according to Tukey's analysis.

Organic extracts: MPI (pineapple); MPL (banana); MCO (coconut water).

control ($p < 0.05$). Los brotes desarrollados en el tratamiento control y el MPL alcanzaron una altura de 20 ± 19 mm y 24 ± 18.8 mm, respectivamente (Figura 3B).

A los 120 días de cultivo, se presentó la formación de yemas en los brotes. El tratamiento MPI desarrolló 2.2 ± 0.5 yemas, lo cual fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) respecto al control, el cual desarrolló sólo 1.5 ± 0.3 yemas. Los tratamientos MCO y MPL registraron el desarrollo de 1.5 ± 0.2 y 1.0 ± 0.3 yemas por explante, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Figura 3C).

Efecto de la concentración de ácido indol acético (AIA) sobre la rizogénesis de los brotes

Para el proceso de rizogénesis de los brotes de *V. planifolia*, en los tratamientos adicionados con AIA se evaluaron dos variables: 1) la producción del número de raíces y 2) la longitud que alcanzaron las raíces desarrolladas. Los resultados mostraron que el máximo porcentaje de brotes con raíces se obtuvo a los 66 días de cultivo en el tratamiento 0.5 AIA el cual presentó un 61 % de respuesta, mientras que el control presentó un 41 % y un 17 % en el tratamiento 1.0 AIA. La mayor producción del número de raíces se obtuvo en el tratamiento adicionado con 0.5 mg L^{-1} de AIA, en el cual se desarrollaron 13.0 ± 0.9 raíces por brote. Los tratamientos control y el adicionado con 1.0 mg L^{-1} de AIA mostraron los valores más bajos para la producción de raíces (5.0 ± 1.0 y 3.0 ± 0.4 raíces por brote, respectivamente) sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

Los resultados observados en el tratamiento 0.5 AIA fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$) respecto a los dos tratamientos restantes (Figura 4A). La longitud de las raíces también fue mayor en el tratamiento adicionado con 0.5 mg L^{-1} de AIA, en el cual las vitroplantas desarrollaron

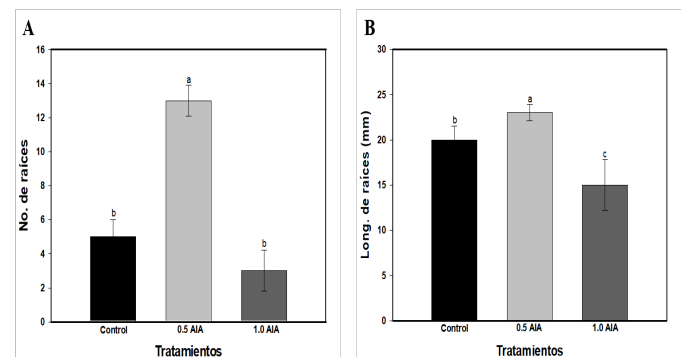


Figura 4. Efecto de las concentraciones de ácido indol acético (0.5 mg L^{-1} y 1.0 mg L^{-1}) sobre la rizogénesis de brotes obtenidos de *V. planifolia*. (A) Producción media del número de raíces desarrolladas; (B) Longitud media de las raíces desarrolladas. Las barras de error representan el error estándar de las concentraciones ($n = 50$). Las medias con diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Figure 4. Indole acetic acid concentrations effect (0.5 mg L^{-1} and 1.0 mg L^{-1}) on the rhizogenesis of *V. planifolia* vitroplants. (A) Average production of developed roots; (B) Average length of developed roots. Error bars represent the standard error of the concentrations ($n = 50$). Means with different letters show significant differences ($p < 0.05$).

una longitud promedio de 23.0 ± 0.9 mm. Este resultado fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) cuando se comparó con los otros dos tratamientos. Finalmente, el tratamiento adicionado con 1.0 mg L^{-1} de AIA registró la menor longitud radicular (15.0 ± 2.8 mm), seguido del tratamiento control (20.0 ± 1.5 mm) (Figura 4B).

Preaclimatación *in vitro* de las plántulas

Después de 45 días del proceso de aclimatación de las vitroplantas de *V. planifolia*, se observó que las plántulas mostraron un incremento en la altura de 18.0 ± 1.2 mm, de 15.0 ± 1.0 mm y de 14.0 ± 0.8 mm en los tratamientos TAA0.5, control TAA1.0, respectivamente (Figura 5A). La respuesta observada en el tratamiento TAA0.5 fue estadísticamente diferente respecto al control ($p < 0.05$).

En cuanto a la formación de hojas nuevas (Figura 5B), se observó la producción de 1.8 ± 0.5 hojas por planta en los tratamientos TAA0.5 y TAA1.0, a diferencia del control (1.0 ± 0.5), resultando estadísticamente significativos ($p < 0.05$).

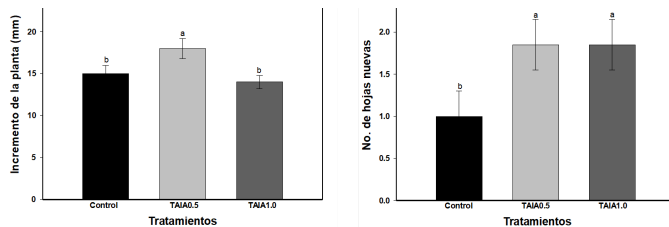


Figura 5. Efecto de las concentraciones de AIA (0.5 mg L^{-1} y 1.0 mg L^{-1}) sobre la pre-aclimatación de vitroplantas de *V. planifolia*. (A) Incremento de la altura desarrollada; (B) Promedio del número de hojas desarrolladas. Las barras de error representan el error estándar de las concentraciones ($n = 50$). Las medias con diferentes letras muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Figure 5. IAA concentrations effect (0.5 mg L^{-1} and 1.0 mg L^{-1}) on the pre-acclimatization of *V. planifolia* vitroplants. (A) Increase in developed height; (B) Average number of leaves developed. Error bars represent the concentrations standard error ($n = 50$). Means with different letters show significant differences ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

En el entorno natural, las orquídeas necesitan de la simbiosis con micorrizas tanto en la etapa de germinación de las semillas como en la etapa de desarrollo de las plántulas (Rasmussen *et al.*, 2015). Sin embargo, a través del cultivo *in vitro*, la mayoría de las orquídeas pueden germinar de manera asimbiótica en un medio de cultivo estéril en el cual se les proporcionan todos los nutrientes necesarios para su desarrollo (Yang *et al.*, 2017). En el caso de *V. planifolia*, sus semillas presentan las mismas limitantes que el resto de las orquídeas para poder germinar. Menchaca, 2019, indica que la germinación de las semillas depende de la etapa de maduración del fruto, por ejemplo, se ha logrado un 50% de germinación *in vitro* en semillas obtenidas después de 154-200 días de polinización natural, y más de un 80% de germinación *in vitro* en semillas producidas después de 44 días de la polinización artificial.

En el presente estudio, la germinación se vio favorecida al colocar las semillas durante 30 días en la oscuridad, lo cual redujo el fenómeno de fotooxidación (Flores-Castaños *et al.*, 2017), y permitió que las semillas comenzaron a germinar a los 60 días, alcanzando un máximo de germinación del 90% a los 90 días de cultivo *in vitro*, y sin la adición de reguladores de crecimiento. Además, el porcentaje de germinación obtenido en este estudio, también se puede atribuir al tamaño del fruto empleado (15 cm), considerándose como un porcentaje alto al compararse con otros estudios realizados con esta misma especie vegetal, en donde se han obtenido porcentajes de germinación del 85 % al añadir otros componentes al medio de cultivo como glutamina y sulfato de adenina (Menchaca-García, 2011), y de un 90 % cuando se utilizaron semillas inmaduras de *V. planifolia* provenientes de frutos con un tamaño máximo de 10 cm, en condiciones similares a las evaluadas en el presente estudio (Flores-Castaños *et al.*, 2017).

En cuanto al tiempo de germinación, éste depende del tipo de especie o híbridos de vainilla con los que se trabaje, por ejemplo se ha reportado que para *V. planifolia* la germinación ocurre de 100 a 130 días, para *V. insignis* ocurre a los 70 días, mientras que para los híbridos de *Vainilla planifolia* x *Vanilla pompona* la germinación ocurre a los 40 días (Menchaca, 2019). Los resultados de germinación observados en esta investigación concuerdan con los tiempos de germinación establecidos para *V. planifolia*, lo cual demuestra que el protocolo establecido fue adecuado para iniciar con la micropropagación de la vainilla.

Existen otros estudios sobre la propagación *in vitro* de vainilla a través del uso de yemas axilares (Lozano-Rodríguez *et al.*, 2015), segmentos nodales (Ayele *et al.*, 2017), esquejes y explantes nodales (Biradar *et al.*, 2016), ápices y brotes apicales (Morwal *et al.*, 2015; Gätjens-Boniche *et al.*, 2018). Sin embargo, en dichos trabajos se utilizan fitohormonas sintéticas para inducir la morfogénesis de los brotes, y no existen reportes en donde se hayan utilizado sustratos naturales como el extracto de plátano, piña y agua de coco en todas las etapas del cultivo *in vitro* como se realizó en el presente estudio.

La adición de sustratos orgánicos naturales como el agua de coco, peptona, homogeneizado de papa, homogeneizado de plátano, jugos, y extracto de levadura puede promover el desarrollo de los brotes cultivados *in vitro* dado que representan una fuente de vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, carbohidratos, péptidos y hormonas de crecimiento (Edy & Sucipto, 2020). En el presente estudio la adición de los extractos naturales favoreció la formación y elongación de brotes a partir de protocormos de *V. planifolia*, al proveerles los nutrientes necesarios para su desarrollo.

En estudios similares, se observó un incremento en el número y longitud de los brotes cuando se utilizó agua de coco en la propagación *in vitro* de la orquídea *Vanda pumil* (Maharjan *et al.*, 2019), así como un incremento significativo en la altura de las plántulas de *Phalaenopsis amboinensis* cuando se utilizó una combinación de extracto de plátano y

agua de coco (Utami & Hariyanto, 2019). Además, la adición de jugo de piña durante la micropropagación de *Dendrobium ovatum* y *Laelia rubescens* Lindl, promovió el desarrollo de las plántulas (Thejaswini y Narasimhan, 2017; Mayo-Mosqueda *et al.*, 2020). Los sustratos naturales favorecen la organogénesis a su vez contribuyen con la disminución de costos en el proceso de propagación *in vitro* (Velázquez-Kú *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado que los sustratos orgánicos como la piña, el plátano y el agua de coco, promueven la morfogénesis y rizogénesis dado que producen efectos similares al de las auxinas y citocininas (Menezes *et al.*, 2016).

En la etapa de la rizogénesis de *V. panifolia* evaluada en este estudio, las raíces que se produjeron en los tratamientos con AIA mostraron vigorosidad y buena calidad, dado que se observaron de un color verde brillante y con desarrollo de velamen (Figura 2D). Estos resultados coinciden con lo reportado por Castillo-Pérez *et al.* (2020), quienes también lograron la producción de velamen en condiciones *in vitro* al propagar la orquídea *Laelia anceps* subsp. *anceps*, además de sugerir que la formación de estas estructuras en las raíces favorece el proceso de aclimatación. Por otro lado, es importante mencionar que la auxina AIA es ampliamente utilizada en procesos de micropropagación *in vitro*, tanto en orquídeas, como en diversas especies forestales y de importancia comercial, dado que promueve y favorece el desarrollo de raíces laterales y adventicias (Jainol y Gansau, 2016; Liao *et al.*, 2017; Elmongy *et al.*, 2018; Seon *et al.*, 2018).

La longitud de las raíces es otra característica favorable que produce el uso del AIA cuando es adicionado a los medios de cultivo para la propagación *in vitro* de plantas. Este efecto se debe principalmente al estímulo que se lleva a cabo en la biosíntesis de proteínas y que repercute de forma positiva en el crecimiento de las raíces (Shahab *et al.*, 2009; Boivin *et al.*, 2016). Interesantemente, los resultados de esta investigación concuerdan con lo reportado por Maharjan *et al.* (2019) quienes establecieron la propagación *in vitro* de la orquídea epífita *Vanda pumila*, y encontraron que la adición de 0.5 mg L⁻¹ de AIA favorece la producción y elongación de raíces. Sin embargo, observaron también que al agregar concentraciones mayores a 1.0 mg L⁻¹ de AIA disminuía el desarrollo y la longitud de las vitroplantas. Además, Maharjan *et al.* (2020) encontraron que al adicionar 1.5 mg/L IAA al medio (½ M.S) se promovía el enraizamiento de las orquídeas *Dendrobium chryseum*.

Finalmente, es importante mencionar que este efecto se ha observado también en el cultivo *in vitro* de otras especies que no pertenecen a la familia Orchidaceae, por ejemplo, en el cultivo *in vitro* de *Dahlia* sp. se observó que las concentraciones mayores a 1 mg L⁻¹ de AIA disminuyeron la producción y elongación de la raíz (Jiménez-Mariña, 2020). La concentración de AIA a emplear, dependerá del tipo de especie vegetal, y del tipo de morfogénesis que se quiera lograr durante la micropropagación. En este estudio, las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg L⁻¹ de AIA favorecieron también la etapa de pre aclimatación *in vitro* en otros soportes em-

pleados como la tierra de jardín, al promover la elongación y maduración de las raíces.

El cultivo de tejidos sigue siendo una herramienta indispensable para la producción comercial de orquídeas, debido a su bajo costo, uniformidad, rápida propagación y alto rendimiento en poco tiempo período de tiempo. Por ejemplo, la mayoría de las orquídeas de flores cortadas (*Dendrobium*, *Oncidium*, *Mokara*, *Aranda*, *Ascocenda*, y *Cattleya alliances*) se propagan con éxito a través de la micropropagación, obteniendo hasta más de 10,000 plántulas a nivel de laboratorio listas para crecer en condiciones de invernadero (Kanchit *et al.*, 2020). Los resultados observados en este estudio demostraron los efectos benéficos de los extractos naturales sobre la micropropagación *in vitro* de *V. planifolia*, el cual en un futuro podría desarrollarse a gran escala para producir de manera comercial esta especie vegetal en la Huasteca Potosina. Además, por tratarse de la única orquídea que produce frutos comestibles, se justifica el uso de sustratos naturales para la producción orgánica de la vainilla. Sin embargo, aún faltan realizar estudios sobre la aclimatación de las plantas en el medio ambiente natural, y determinar si esta aclimatación requerirá de la simbiosis con las micorrizas de las plantaciones naturales. Por ello, es importante la vinculación con los sectores sociales y productivos, de manera que en un futuro cercano se logre la transferencia de tecnología desarrollada a los productores de vainilla de la región Huasteca.

CONCLUSIONES

Se logró el 90% de germinación *in vitro* asimbiótica para las semillas de *V. planifolia*, y la formación de protocormos. La adición de extractos naturales a los medios de cultivo favoreció la formación de brotes y de plantas *in vitro*, reduciendo así el uso de fitohormonas sintéticas. Los resultados mostraron que el mejor tratamiento fue el extracto de piña, en donde se observó la formación de 5.7 ± 3.5 brotes de 36.9 ± 7.3 mm de altura, y de 2.2 ± 0.5 yemas por brote. Además, se logró la formación de 13.0 ± 1.1 raíces por brote con la adición de 0.5 mg L⁻¹ de AIA, y la pre aclimatación de las plantas en condiciones *in vitro*. Estos resultados contribuyen a la creación de una nueva metodología de micropropagación *in vitro* para la vainilla, la cual contribuirá a reducir la presión de la sobreexplotación de *V. planifolia*, y permitirán su conservación en la Huasteca Potosina. Además, en un futuro esta herramienta biotecnológica podrá explotarse a nivel comercial para la propagación masiva de vainilla.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el financiamiento del proyecto 269491/2016. KLTG y LJCP agradecen al CONACYT por la beca otorgada para realizar los estudios de posgrado.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores de este trabajo no tienen ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Alberto Mayo-Mosqueda, A., Maceda-López, L.F., Andrade-Canto, S.B., Noguera-Savelli, E., Caamal-Velázquez, H., Cano-Sosa, J.S., Alatorre-Cobos, F. 2020. Efficient protocol for *in vitro* propagation of *Laelia rubescens* Lindl. from asymbiotic seed germination. South African Journal of Botany, 133, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.07.030>.
- Ayele, Y. B., Tefera, W., Bantte, K. 2017. Enhanced Protocol Development for *in vitro* Multiplication and Rooting of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andr.) Clone (Van. 2/05). Biotechnology Journal International, 1-11.
- Biradar, V., Inamdar, A., Shamse, A., Patil, M. S. 2016. *In vitro* Studies on the influence of different concentrations of growth regulators on economically important orchid, *Vanilla planifolia*. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci, 5, 311-323.
- Bovin, S., Fonouni-Farde, C., Frugier, F. 2016. How auxin and cytokinin phytohormones modulate root microbe interactions. Frontiers in plant science, 7, 1240.
- Castillo-Pérez, L. J., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, A. J., Carranza-Álvarez, C. 2020. Efecto de 6-bencilaminopurina y nitrato de potasio sobre la micropropagación *in vitro* de *Laelia anceps* subsp. *anceps* (Orchidaceae). Biotecnia, 22(1), 32-38.
- Chomicki, G., Bidel, L. P., Ming, F., Coiro, M., Zhang, X., Wang, Y., Baissac, Y., Jay-Allemand, C., Renner, S. S. 2015. The velamen protects photosynthetic orchid roots against UV-B damage, and a large dated phylogeny implies multiple gains and losses of this function during the Cenozoic. New Phytologist, 205: 1330-1341.
- Debnath, S. C. 2009. Characteristics of strawberry plants propagated by *in vitro* bioreactor culture and ex vitro propagation method. Engineering in Life Sciences, 9, 239-246.
- Elmogy, M. S., Cao, Y., Zhou, H., Xia, Y. 2018. Root development enhanced by using Indole-3-butyric acid and naphthalene acetic acid and associated biochemical changes of *in vitro* azalea microshoots. Journal of Plant Growth Regulation, 37(3), 813-825.
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S. 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta, 248, 1-18.
- Flores Castaños, O., Cuéllar Zometa, J.F., Montes de Godoy, M.E., Gámez Pastrana, M.R., González Arnao, M.T., Guevara Valencia, M., Aguilar Rivera, N. 2017. Germinación *in vitro* de semillas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. Avances en Investigación Agropecuaria, 21.
- Gätjens-Boniche, O., Acuña-Matamoros, C.L., Montero-Carmona, W., Díaz, C., Torres, S. 2018. Propagación masiva y formación de callos protocórmicos de vainilla a partir de ápices radicales. Polibotánica. 45: 157-180.
- Gaudencio-Sedano C., Manzo-Alejandro G., Reymundo-Roldán H, Castellanos J.A. 2015. Propagación *in vitro* de orquídeas y otras ornamentales. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas. 12: 451-456.
- Hernández-Hernández, J. 2011. Paquete tecnológico vainilla (*Vanilla planifolia* Jackson). Establecimiento y mantenimiento (Programa Estratégico para el desarrollo Rural Sustentable de la Región Sur-Sureste: Trópico Húmedo). Tlapacoyan, Veracruz: SAGARPA-INIFAP.
- Jainol, J. E., Gansau, J. A. 2016. Effect of growth regulators and explant orientation on shoot tip culture of Borneo endemic orchid, *Dimorphorchis lowii*. Transactions on Science and Technology, 3(2), 306-312.
- Jiménez-Mariña, L. 2020. Metodología de propagación *in vitro* de *Dahlia sp.* Avances, 22(3), 406-422.
- Kanchit Thammasiri, Nipawan Jitsopakul, Sasikarn Prasongsom 2020. Micropropagation of Some Orchids and the Use of Cryopreservation. En: Mérillon, J.M. & Kodja H. (eds.). Orchids Phytochemistry, Biology and Horticulture, Series in Phytochemistry, https://doi.org/10.1007/978-3-030-11257-8_10-1.
- Kelso-Bucio, H.A., Bâ, K.M., Sánchez-Morales, S., Reyes-López, D. 2012. Estimación *in situ* del Kc ini de la vainilla (*Vanilla planifolia* A). Agrociencia, 46, 499-506.
- Liao, X., Lovett, B., Fang, W., & St Leger, R. J. 2017. *Metarhizium robertsii* produces indole-3-acetic acid, which promotes root growth in Arabidopsis and enhances virulence to insects. Microbiology, 163(7), 980-991.
- Lozano-Rodríguez, M.Á., Menchaca-García, R.A., Alanís-Méndez, J.L., Pech-Canché, J.M. 2015. Cultivo *in vitro* de yemas axilares de *Vanilla planifolia* Andrews con diferentes citocinas. Revista Científica Biológico-Agropecuaria Tuxpan, 4, 1153-1165.
- Luna-Guevara, J.J., Ruiz-Espinosa, H., Herrera-Cabrera, E.B., Navarro-Ocaña, A., Delgado-Alvarado, A., Luna-Guevara, M.L. 2016. Variedad de microflora presente en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) relacionados con procesos de beneficiado. Agroproductividad, 9, 3-9.
- Maharjan, S., Pradhan, S., Thapa, B. B., Pant, B. 2019. *In vitro* propagation of endangered orchid, *Vanda pumila* Hook. f. through protocorms culture. American Journal of Plant Sciences, 10(07), 1220.
- Maharjan, S., Thakuri, L., Thapa, B., Pradhan, S., Pant, K., Joshi, G., Pant, B. (2020). *In vitro* propagation of the endangered orchid *Dendrobium chryseum Rolfe* from protocorms culture. Nepal Journal of Science and Technology, 19(1), 39-47. <https://doi.org/10.3126/njst.v19i1.29737>.
- Menchaca-García, R.A. 2011. Manual para la propagación de orquídeas. 1st ed. Comisión Nacional Forestal. México.
- Menchaca-García, R.A. 2019. *In vitro* Propagation of *Vanilla*. En: Daphna Havkin-Frenkel, Faith C. Belanger (eds). Handbook of Vanilla. Science and Technology. Second Edition. ISBN: 978-1-119-37727-6.
- Menchaca-García, R.A., Ramos, J.M., Moreno, D., Luna, M., Mata, M., Vázquez, L.M., Lozano, M.A. 2011. Germinación *in vitro* de híbridos de *Vanilla planifolia* y *Vanilla pompona*. Revista colombiana de biotecnología, 13, 80-84.
- Menezes-Gonçalves, L., Machado, M., Ballesta, P., Mora, F., Milaneze, M., Mangolin, C. 2016. Suplementos orgánicos para el cultivo *in vitro* del híbrido *Laeliocattleya* (Orchidaceae). Idesia 34 (1), 47-54.
- Morwal, G., Jadhav, S.J., Shinde, A., Mandge, N., Mandge, N. 2015. Conservation of *Vanilla planifolia* by *in vitro* micropropagation method. In Special issue national conference "ACGT (pp. 13-14).
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. Physiologia Plantarum. 15(3), 473-497.

- Norma Oficial Mexicana "Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo". 2010. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091.
- Rao, S. R., Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20, 101-153.
- Rasmussen Hn, Dixon Kw, Jersáková J. Y Těšitelová T. 2015. Germinación y establecimiento de plántulas en orquídeas: un complejo de requisitos. *Ann Bot* 116, 391-402.
- Reyes-Hernández, H., Trinidad-García, K.L., Herrera-Cabrera, B.E. 2018. Caracterización del ambiente de los vainillales y área potencial para su cultivo en la Huasteca Potosina. *Biotecnia*, XX, 49-57.
- SAGARPA (2010). Estudio de oportunidades de mercado internacional para la vainilla mexicana. http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/Estudios_promercado/VAINILLA.pdf.
- Seon, K., Kim, D., Kang, K., Sivanesan, I. 2018. Highly competent *in vitro* propagation of *Thrixspermum japonicum* (Miq.) Rchb., a rare epiphytic orchid. *Plant. In vitro cellular & developmental biology*, 54, 302-308.
- Shahab, S., Ahmed, N., Khan, N. S. 2009. Indole acetic acid production and enhanced plant growth promotion by indigenous PSBs. *African Journal of Agricultural Research*, 4(11), 1312-1316.
- Soto Arenas, M. (2006). La vainilla: retos y perspectivas de su cultivo. *Biodiversitas* 66:1-9.
- Soto-Arenas, M.A. 1999. Filogeografía y recursos genéticos de las vainillas de México. Project J101, CONABIO, México.
- Soto-Arenas, M.A. 2003. Vainilla. En: Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN (ed) *Genera orchidacearum: Orchidoideae*, Oxford University Press, EUA.
- Thejaswini, R., Narasimhan, S. 2017. Undefined organic additives stimulate *in vitro* seed germination of *Dendrobium ovatum* (Willd.) Kraenzl, a medicinal orchid. *Int J Pharma Med Biol Sci*, 6, 29-31.
- Torres-González, M.J., Aguirre-Medina, J.F., Iracheta-Donjuan, L. 2011. Germinación de semilla y obtención de plantulas de *Vanilla planifolia* Andrews en condiciones *in vitro*. *Agroproductividad*, 4, 3-9.
- Utami, E.S.W., Hariyanto, S. 2020. Organic Compounds: Contents and Their Role in Improving Seed Germination and Protocorm Development in Orchids. *International Journal of Agronomy*, 12. <https://doi.org/10.1155/2020/2795108>.
- Vargas Hernández, J., Gámez Velázquez, H.G. 2014. Producción de vainilla en tres sistemas de producción en la Sierra Huasteca Potosina. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 31 pp.
- Velazquez-Kú, N.V., Quijano-Ávila, J. C., Rodríguez-Ávila, N.L. 2016. Análisis de diferentes sustratos en la germinación y multiplicación *in vitro* de orquídeas silvestres del estado de Campeche. *Revista del centro de graduados e investigación*, 31, 27-31.
- Yang, F. S., Sun, A. H., Zhu, J., Downing, J., Song, X. Q., Liu, H. 2017. Impacts of host trees and sowing conditions on germination success and a simple *ex situ* approach to generate symbiotic seedlings of a rare epiphytic orchid endemic to Hainan Island, China. *The Botanical Review*. 83: 74-86.

Evaluación del efecto de los SNPs G530A (*calpaína*), C357G (*calpastatina*), G1795A (*miopaladina*) y G1181A (PPARGC1A) sobre la terneza de carne bovina de una región del Estado de Veracruz, México

Evaluation of the effect of G530A (*calpain*), C357G (*calpastatin*), G1795A (*myopaladin*) and G1181A (PPARGC1A) SNPs, on beef tenderness of a region of Veracruz State, Mexico

Ana Elvia Sánchez Mendoza^{a,b*}, Salvador Fonseca Coronado^c, Carlos Ignacio Soto Zárate^d, Luis Humberto López Hernández^e, Rosalia Meléndez Pérez^f, José Francisco Montiel Sosa^a.

^a Laboratorio de Biotecnología en Alimentos y Análisis de DNA Mitocondrial.

^b Posgrado en ciencias de la producción y sanidad animal.

^c Laboratorio de Inmunobiología de enfermedades infecciosas.

^d Laboratorio de Morfología Veterinaria y Biología Célula.

^e Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Km 1, carretera a Colón, C.P. 76280. Ajuchitlán, Colón, Querétaro, México.

^f Laboratorio de Análisis Térmico y Estructural de Alimentos, UIM, FES- Cuautitlán, UNAM. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, C.P. 54740. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

RESUMEN

La terneza es una característica importante para comercializar la carne de bovino, la cual se ha asociado a factores genéticos, como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). El objetivo de este trabajo fue analizar la distribución genotípica y alélica de los SNPs G530A, C357G, G1795A y G1181A para establecer asociación con la terneza. Se obtuvieron 90 muestras de músculo *longissimus dorsi*. Se determinó la terneza como fuerza de corte de Warner-Bratzler. La genotipificación de los SNPs se realizó por PCR-RFLP. Mediante un modelo lineal generalizado (GLM) se evaluó la asociación entre los SNPs y la terneza. El efecto de los alelos se determinó por análisis de sustitución alélica. Se determinó que el grupo genético influyó sobre la terneza ($p < 0.05$). Para los SNPs C530A y G1181A se obtuvo menor frecuencia para los genotipos AA, mientras que para los SNPs C357G y G1795A se observaron mayores frecuencias para los genotipos ancestrales CC y GG. No se encontró asociación genotípica o alélica entre los SNPs y la terneza. Esto evidencia la importancia de llevar a cabo análisis regionales de asociación entre SNPs y características de calidad en la búsqueda de su introducción en programas de selección asistida por marcadores moleculares.

Palabras clave: SNPs, PCR-RFLP, bovino, calidad de la carne, terneza

ABSTRACT

Tenderness, an important characteristic for marketing beef, has been associated with genetic factors, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs). The aim of this work was to analyze the genotypic and allelic distribution of G530A, C357G, G1795A and G1181A SNPs to establish an association with meat tenderness. Ninety samples of *longissimus dorsi* muscle were obtained. Tenderness was determined as a

Warner-Bratzler shear force. SNPs genotyping was performed by PCR-RFLP. Using a generalized linear model (GLM), we evaluated the association between SNPs and tenderness. The effect of the alleles was determined by allelic substitution analysis. It was determined that the genetic group influenced tenderness ($p < 0.05$). For C530A and G1181A SNPs, a lower frequency was obtained for the AA genotypes, while for C357G and G1795A SNPs higher frequencies were observed for the ancestral CC and GG genotypes. We found no genotypic or allelic association between SNPs and tenderness. This shows the importance of carrying out regional analysis of association between SNPs and quality characteristics to introduce them favorably through marker-assisted selection programs.

Keywords: SNPs, PCR-RFLP, cattle, meat quality, tenderness.

INTRODUCCIÓN

La inconsistencia en la calidad de la carne es uno de los grandes retos que enfrenta la industria cárnica en México, causada por la falta de estrategias para producir ganado con características constantes y definidas (Bonilla *et al.*, 2010). Los principales atributos que determinan la calidad de la carne son el color, la grasa intramuscular, el área del ojo del lomo y la palatabilidad. La palatabilidad, se relaciona con la terneza, la jugosidad y el sabor; de las anteriores, la terneza es la más importante para el consumidor como criterio de calidad (Li *et al.*, 2013). La terneza es un atributo complejo, que se encuentra bajo el control de genes específicos y en existe evidencia que demuestra la existencia de una proporción significativa de la variabilidad fenotípica asociada a este atributo (Hocquette *et al.*, 2007). La selección de los animales basándose en marcadores moleculares asociados a ésta característica puede ser una herramienta adicional a los esquemas normalmente utilizados en el mejoramiento genético animal (Enriquez *et al.*, 2017). En México, se desconoce el

*Autor para correspondencia: Ana Elvia Sánchez Mendoza
Correo electrónico: anaesm@comunidad.unam.mx

Recibido: 8 de octubre de 2019

Aceptado: 27 de junio de 2020

efecto en la implementación de estos marcadores genéticos. Sin embargo, se conoce al menos la frecuencia en la que las variantes favorables se presentan en algunas poblaciones y razas bovinas, lo que ayuda a inferir las ventajas de contar con esta información (Parra *et al.*, 2011; Desgarenes *et al.*, 2017).

En la actualidad se han identificado algunos SNPs como predictores de asociación con la terneza. La μ -calpaína codificada por el gen CAPN1, es la principal enzima involucrada en la terneza de la carne debido a las bajas concentraciones de calcio que se requieren para su activación, dentro de este gen se encuentra el SNP G530A el cual provoca un cambio de adenosina por guanina en el codón 530 (GTC/ATC), lo que resulta en el intercambio de una valina por isoleucina, esta alteración es relativamente conservada, aunque puede modificar la estabilidad de la proteína y su ensamblaje, lo que podría afectar su actividad proteolítica, por lo que este SNP se ha asociado fuertemente con la terneza (Page *et al.*, 2002; Curi *et al.*, 2009; Soria *et al.*, 2010; Leal *et al.*, 2015). La calpastatina es una enzima inhibidora de la actividad proteolítica de las calpaínas, se codifica por el gen CAST (Motter *et al.*, 2009; Lenis *et al.*, 2018), en donde se han reportado SNPs asociados con la terneza de la carne bovina (Motter *et al.*, 2009; Chung y Davis, 2012; Desgarenes *et al.*, 2017). Sin embargo, hay pocos estudios sobre las variaciones de secuencias o cambios en las regiones reguladoras potenciales que pudieran explicar las diferencias fenotípicas en la calidad de la carne. Juszczuk-Kubiak *et al.* (2009), sugieren que el SNP C357G localizado en el exón 1u asociado al promotor III, podría tener influencia sobre la expresión de este gen y repercutir en rasgos importantes de la calidad como la terneza. Las múltiples funciones en los ensamblajes de proteínas de la línea Z y la banda I atribuidas a la proteína Miopaladina codificada por el gen MYPN, demuestran una asociación de los SNPs de este gen con la terneza. Jiao *et al.* (2010) estudiaron el SNP G1795A y su asociación con ciertas características fenotípicas, como la pérdida de retención de agua, lo que favorece la disminución de la terneza de la carne. Por otro lado, MYPN se une a la proteína cardíaca de repetidos de anquirina (CARP) (Bang *et al.*, 2001; Mestroni, 2009). La sobreexpresión de la región de unión CARP con miopaladina podría provocar una interrupción severa de los componentes sarcoméricos, lo cual sugiere que la organización miofibrilar está relacionada con la expresión génica en el músculo a través de la interacción de miopaladina con CARP (Bang *et al.*, 2001; Knöll, Hoshijima y Chien, 2002), esto convierte al gen de miopaladina y sus SNPs como posibles candidatos asociados a terneza. El gen receptor gama coactivador 1- α , activado por el proliferador de peroxisoma (PPARGC1a) tiene funciones en la regulación del metabolismo de la energía oxidativa en el músculo esquelético (Eivers *et al.*, 2012) además de mediar la expresión de genes involucrados en la adipogénesis provocando un aumento en el contenido de grasa intramuscular lo que sugiere una influencia potencial sobre la terneza (Lin, Handschin y Spiegelman, 2005; Zou *et al.*, 2014). La presencia del SNP G1181A en este gen, provoca

la sustitución del aminoácido serina por asparagina, lo cual interrumpe un sitio de fosforilación de la caseína kinasa II, lo que puede afectar importantes rasgos como la terneza (Soria *et al.*, 2009).

Los SNPs analizados en el presente trabajo se han descrito ampliamente en diferentes grupos genéticos y zonas geográficas a nivel mundial, por lo que estos SNPs han sido propuestos como importantes marcadores asociados a la terneza para su implementación en programas de Selección asistida por marcadores (SAM).

La identificación de la presencia de estos SNPs en los programas de selección asistida por marcadores moleculares (SAM) depende de la validación de sus efectos sobre los rasgos de interés en diferentes condiciones de manejo y ambiente, por lo que su evaluación es muy importante para asegurar la eficacia en su implementación (Van Eenennaam *et al.*, 2007; Parra *et al.*, 2011).

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue analizar la distribución genotípica y alélica de los SNPs G530A, C357G, G1795A y G1181A para establecer su asociación con la terneza de carne de bovinos del Estado de Veracruz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y toma de muestra

Se obtuvieron 90 muestras de 5cm de espesor del músculo *longissimus dorsi* (entre la 12va y 13va vértebra lumbar), provenientes de toros no castrados, alojados en corrales de una unidad comercial de finalización del sur de Veracruz, con un peso promedio de 470 ± 20 kg y edad de 18 a 21 meses, los cuales fueron faenados bajo los lineamientos de la NOM-033-SAG/ZOO-2014, en el rastro de Tipo Inspección Federal 35, ubicado en el Km 2.5, carretera Paso San Juan, Veracruz. Las muestras se clasificaron de acuerdo a su grupo genético, observando las principales características fenotípicas reportadas por Rubio *et al.* (2013), en *Bos taurus*, *Bos indicus* y la cruce *Bos taurus* x *Bos indicus*.

A cada corte obtenido se le retiró una muestra de 250 mg de tejido, estas muestras se depositaron en tubos con 1 mL de Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Ca, EE.UU.) y se mantuvieron a -20°C hasta realizar los análisis moleculares correspondientes.

Determinación de fuerza de corte

La fuerza de corte de Warner-Bratzler de las muestras cocidas se determinó de acuerdo con el método descrito por la AMSA (2015). Inicialmente se descongelaron a 4°C durante 24 h, se les retiró la grasa y el tejido conectivo, a continuación fueron sometidas a un proceso de cocción en una parrilla eléctrica (Westinghouse, Pittsburgh, PA, EE.UU). La superficie de la parrilla se calentó a 200°C antes de la cocción. Las muestras se cocinaron hasta que alcanzaron una temperatura interna de 70°C verificando la temperatura en el centro geométrico de cada muestra utilizando un termopar tipo T de bayoneta (Testo, 0602 1081, Barcelona, Esp). Al término de la cocción, se colocaron individualmente en bolsas de plástico

y se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, a continuación se realizaron seis cortes cilíndricos en forma paralela a la orientación longitudinal de las fibras musculares con un dispositivo de extracción manual (sacabocado). A cada cilindro se le cortó con una cuchilla Warner-Bratzler del analizador de textura TA-XT plus (Stable Micro Systems, Godalming, LDN, UK) que operó a una velocidad de prueba de 2 mm/s. Los valores de la fuerza de corte se registraron como el esfuerzo máximo expresado en kg, el valor promedio de los cortes se utilizó para el análisis estadístico.

Identificación de SNPs

El ADN genómico se extrajo de las muestras de carne empleando el protocolo propuesto por Sambrook, J. (2012) el cual se basa en la disgregación del tejido con 1250 µL de solución de lisis y 7 µL de proteinasa k (Bioline, Memphis, TE, EE.UU), seguido de la extracción de proteínas y polisacáridos con 250 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) y finalmente la precipitación de ADN con 1000 µL de etanol frío (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.)

La identificación de los SNPs, se llevó a cabo mediante primers específicos usando las secuencias reportadas en GenBank de acuerdo con los siguientes números de acceso: calpaína AF248054, calpastatina AH014526.1 y miopaladina NC_007329. En el caso del gen PPARG1A se utilizaron los primers reportados por Soria *et al.* (2009) (Tabla 1). La mezcla de reacción para la PCR se preparó bajo las siguientes condiciones en un volumen total de 25 µL: 0.5 µL de cada primer, 10 µL de agua libre de nucleasas, 60 ng de ADN y 12.5 µL de la mezcla Master mix (Promega Corporation, Fitchburg, WI), la cual contiene 50 unidades/mL de Taq ADN polimerasa, 400 µM de cada dNTP y 3 mM de MgCl₂. Las condiciones de amplificación de cada gen fueron calculadas de acuerdo a las recomendaciones del kit de Promega, considerando la temperatura de hibridación de cada pareja de primers. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con 0.4 µg de bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta (Bio – Imaging Systems, Dún Laoghaire, Dublin).

Genotipificación de SNPs

La genotipificación de cada SNPs se realizó mediante RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción), digiriendo los productos de PCR con enzimas de restricción específicas. Las enzimas empleadas fueron: Ava II (G530A), Hae III (G1795A), Taq I (C357G) y Bst I (G1181A). Las digestiones se realizaron en reacciones de 10 µL compuestas por 5 µL del producto de PCR, 3.6 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL de solución tampón y 0.4 µL de enzima, la temperatura empleada fue la recomendada por el fabricante (New England Biolabs, Ipswich, MA). Los patrones de digestión se visualizaron en geles de acrilamida:bis al 12% (29:1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL, Gene Choice, Inc., Frederick, MD, EE.UU.).

Tabla 1. Primers empleados en la identificación de los SNPs.

Table 1. Primers used for SNPs identification.

GEN	SNP	Secuencia	Tm (°C)	Amplificado (pb)
Calpaína	A > G	F: 5'-TCTGCAGAGAGCTG GATGAC-3' R: 5'-TGCTGGGCTAGAGAC CAAGAC-3'	56	119
Calpastatina	G > C	F: 5'-GCTAGCCAAGGCTACA TCTCC-3' R: 5'-AAGCATGCGAACTG AAACGC-3'	59	101
Miopaladina	A > G	F: 5'-TCTGTACTTTGGTCATT GCTGAG-3' R: 5'-CCCTGGTCTAGACGG TTATGG-3'	55	150
PPARGC1A*	A > G	F: 5'-TCAGCAAGACCTCTGTGCTCA- GCA-3' R: 5'-TGCTCACCTCCGGTCTCT-3'	62	255

*Secuencias reportadas por Soria *et al.*, (2009).

Análisis estadístico

La prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) se realizó para cada SNP, la cual determinó cuales frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias de los alelos (Iniesta, Guinó y Moreno, 2005). Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas de acuerdo a Iniesta, Guinó y Moreno, (2005). El equilibrio HW se determinó mediante la prueba de χ² (Ji cuadrada) usando el programa SPSS (26.0, 2019).

La prueba de asociación entre los genotipos y los rasgos de interés se llevó a cabo mediante el método de mínimos cuadrados y el procedimiento del modelo lineal generalizado (GLM) a través del programa SPSS (26.0, 2019) (Curi *et al.*, 2010; Chung y Davis 2012; Valencia y Zuluaga 2012; Enríquez *et al.*, 2017). El modelo utilizado para ajustar las variables cuantitativas de interés incluyó el efecto fijo del genotipo de cada SNP y el efecto fijo del grupo genético y fue el siguiente:

$$Y_{ijklm} = \mu + G1_i + G2_j + G3_k + G4_l + GG_m + \epsilon_{ijklm}$$

Donde:

Y_{ijklm} = Variable dependiente (WBSF)

µ = media global.

G1_i = efecto fijo del i-ésimo genotipo de G530A.

G2_j = efecto fijo del j-ésimo genotipo de C357G.

G3_k = efecto fijo del k-ésimo genotipo de G1795A.

G4_l = efecto fijo del l-ésimo genotipo de G1181A.

GG_m = efecto fijo del m-ésimo grupo genético.

ε_{ijklm} = error aleatorio.

Los efectos fijos que fueron significativos se analizaron mediante una prueba de comparación de medias de Tukey a través del programa SPSS (26.0, 2019) para determinar las diferencias entre los niveles de cada uno de los efectos.

El efecto de los alelos de cada SNP sobre la ternera se determinó mediante un análisis de sustitución alélica, para lo cual se transformó la información de la genotipificación en información cuantitativa asignándole valores de 0 al genotipo ancestral, 1 al genotipo heterocigoto y 2 al genotipo de la variante genética para cada SNP. Este análisis se realizó

a través de una regresión lineal simple en el programa SPSS (26.0, 2019) (Valencia y Zuluaga 2012; Arango, Echeverri y López 2014) aplicando el siguiente modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_i$$

Donde:

Y: Variable dependiente (WBSF).

β_0 : Intercepto.

β_1 : Coeficiente de regresión estimado para la sustitución alélica de cada SNP (G530A, C357G, G1795A y G1181A).

X_i : Número de alelos de la variante genética (0, 1 o 2).

RESULTADOS

Fuerza de corte (WBSF)

La fuerza de corte presentó una media global de 6.40 kg, el análisis estadístico mostró que el grupo genético es un factor que influye significativamente sobre el rasgo de calidad. Los resultados obtenidos cuando se analizaron por medio de la prueba de Tukey mostraron una diferencia significativa de la terneza entre los grupos genéticos *Bos taurus* V.S *Bos indicus* ($p < 0.05$), en donde se observó que la carne de *Bos taurus* fue más tierna (6.083 ± 0.124 kg) al compararla con la de *Bos indicus* (6.861 ± 0.097 kg), por otro lado, en la carne procedente de la cruce, no se observaron diferencias significativas al compararlas con los otros dos grupos genéticos que fueron estudiados (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del grupo genético sobre la fuerza de corte Warner-Bratzler (WBSF) en carne bovina.

Table 2. Genetic group effect on Warner-Bratzler shear force (WBSF) in beef.

Grupo genético	N	WBSF (kg) Media \pm ESM
<i>Bos taurus</i>	31	6.083 \pm 0.124 ^b
<i>Bos taurus</i> x <i>Bos indicus</i>	30	6.405 \pm 0.093 ^{ab}
<i>Bos indicus</i>	29	6.861 \pm 0.097 ^a

Comparación de medias por la prueba de Tukey. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.001$).

Frecuencias genotípicas y alélicas de los SNPs G530A (calpaína), C357G (calpastatina), G1795A (miopaladina) y G1181A (PPARGC1a)

Los resultados de las frecuencias genotípicas y alélicas determinadas para cada SNP se observan en la tabla 3.

El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió en tres SNPs; G530A, G1795A y G1181A, mientras que el SNP de calpastatina (C357G) no cumplió con el criterio de equilibrio ($p \leq 0.05$).

Los tres genotipos fueron detectados en todos los SNPs estudiados. Para el SNP de calpaína, el genotipo favorable para terneza (AA) tuvo una baja frecuencia (0.011). El genotipo GG fue el dominante, ya que presentó una alta frecuencia (0.767).

El SNP G1181A del gen PPARGC1 mostró una baja frecuencia para el genotipo AA, correspondiente a la variante genética (0.033), en el genotipo GG este SNP presentó una mayor frecuencia (0.522).

Tabla 3. Frecuencias genotípicas y alélicas para los SNPs.

Table 3. Genotypic and allelic frequencies for SNPs.

SNP	Genotipo	N	Frecuencia genotípica	Alelo	Frecuencia Alélica	Equilibrio HW
G530A <i>calpaína</i>	AA	1	0.011	A	0.122	**
	GG	69	0.767			
	AG	20	0.222	G		
C357G <i>calpastatina</i>	GG	7	0.078	G	0.183	NE
	CC	64	0.711			
	GC	19	0.211	C		
G1795A <i>miopaladina</i>	AA	21	0.233	A	0.517	**
	GG	18	0.200			
	AG	51	0.567	G		
G1181A <i>PPARGC1a</i>	AA	3	0.033	A	0.256	**
	GG	47	0.522			
	AG	40	0.444	G		

HW = Equilibrio de Hardy-Weinberg; ** ($p < 0.01$); NE (no equilibrio de HW) = ($p > 0.05$).

En el SNP C357G (calpastatina) la mayor frecuencia se observó en el genotipo CC (0.711), mientras que la menor frecuencia la presentó el genotipo GG (0.078).

Por último, para el SNP G1795A de miopaladina, el genotipo heterocigoto AG presentó una alta frecuencia (0.567), la menor frecuencia de este SNP la presentó el genotipo ancestral GG (0.200).

Efecto de los SNPs G530A (calpaína), C357G (calpastatina), G1795A (miopaladina) y G1181A (PPARGC1a) sobre la terneza

El factor del genotipo AA del SNP G530A se descartó para el análisis estadístico, debido a la baja frecuencia mostrada en la población.

Los resultados de la aplicación del modelo de asociación de los SNPs con la terneza no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) lo cual sugiere que ninguno de los SNPs influye sobre la terneza de la carne de los animales analizados (tabla 4).

Efecto de la sustitución alélica de los SNPs G530A (calpaína), C357G (calpastatina), G1795A (miopaladina) y G1181A (PPARGC1a) sobre la terneza

Los resultados del análisis de regresión lineal entre los alelos de cada SNP y las variaciones de la terneza se muestran en la tabla 5. De acuerdo con el valor de β_1 , la terneza se incrementa 0.261 kg con la presencia del alelo A para el SNP G530A, de igual forma para el SNP G1181A la presencia del alelo A incrementa la terneza 0.091kg. Mientras que para los SNPs C357G y G1795A los alelos de la variante genética repercutieron en una disminución de la terneza de 0.021kg y 0.081kg, respectivamente. El análisis estadístico mostró que para todos los SNPs el efecto de la sustitución alélica no fue significativo ($p > 0.05$), estos resultados sugieren que la presencia del alelo de la variante genética no tiene un efecto sobre la terneza de la carne de la población analizada.

Tabla 4. Efecto de los SNPs G530A, C357G, G1795A y G1181A sobre la fuerza de corte Warner-Bratzler (WBSF) en carne bovina.

Table 4. Effect of G530A, C357G, G1795A and G1181A SNPs on Warner-Bratzler shear force (WBSF) in beef.

SNP	Genotipo	N	WBSF (kg) Media ± ESM
G530A <i>Calpaína</i>	AA	-	-
	GG	69	6.4633 ± 0.0724
	AG	20	6.278 ± 0.163
C357G <i>Calpastatina</i>	GG	7	6.603 ± 0.186
	CC	64	6.441 ± 0.075
	GC	19	6.228 ± 0.180
G1795A <i>Miopaladina</i>	AA	21	6.371 ± 0.135
	GG	18	6.540 ± 0.149
	AG	51	6.378 ± 0.092
G1181A <i>PPARGC1a</i>	AA	3	6.890 ± 0.040
	GG	47	6.401 ± 0.110
	AG	40	6.384 ± 0.088

No existen diferencias significativas, $p > 0.05$.

Tabla 5. Efecto de la sustitución alélica de cada SNP sobre la fuerza de corte Warner-Bratzler; I (intercepto), β_1 (coeficiente de regresión entre los genotipos de los diferentes SNPs y la fuerza de corte).

Table 5. Allelic substitution effect of each SNPs on the Warner-Bratzler shear force (WBSF); I (intercept), β_1 (regression coefficient between the genotypes of the different SNPs and the Warner-Bratzler).

SNP	I	β_1	p
G530A <i>(calpaína)</i>	6.473	0.261	0.079
C357G <i>(calpastatina)</i>	6.417	-0.021	0.847
G1795A <i>(miopaladina)</i>	6.493	-0.081	0.432
G1181A <i>(PPARGC1a)</i>	6.363	0.091	0.452

No existen diferencias significativas, $p > 0.05$.

DISCUSIÓN

La validación de los SNPs y su relación con la terneza de la carne es importante para el desarrollo e implementación de los programas de mejoramiento genético en los bovinos.

Los resultados del factor fijo del grupo genético mostraron tener una influencia sobre la terneza, ya que se observaron en los grupos genéticos estudiados diferencias en este rasgo y los cuales son similares con los reportados por otros autores (Casas *et al.*, 2006; Soria *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2002; De Souza *et al.*, 2017), quienes sugieren que además

del factor grupo genético esas diferencias se pueden atribuir a SNPs presentes en genes que desempeñan un papel determinante durante el proceso de tenderización.

Las frecuencias genotípicas para un gen pueden ser afectadas por diferentes fuerzas evolutivas como; mutación, deriva genética, selección natural, selección dirigida de rasgos fenotípicos de producción, migración, las cuales pueden aumentar la diferenciación genética de las poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2013). Los resultados de la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg, no se cumplió para el SNP de calpastatina (C357G), lo cual podría deberse a los factores anteriormente mencionados.

El genotipo AA del SNP G530A se ha asociado con la terneza por Casas *et al.* (2006), Van Eenennaam *et al.* (2007), Allais *et al.* (2011) y Li *et al.* (2010), quienes reportaron que el ganado con este genotipo presenta carne más blanda en comparación con animales con genotipos AG y GG, sin embargo, en este estudio el genotipo AA mostró una baja frecuencia ya que sólo se identificó en un animal del grupo genético *Bos taurus*, mientras que el genotipo GG fue el predominante para todos los grupos genéticos, estos resultados son similares a los reportados por Casas *et al.* (2005), quienes mencionaron la ausencia del alelo A en animales *Bos indicus*.

Por otro lado, los resultados no mostraron asociación del SNP G530A con la terneza, lo cual concuerda con lo reportado por Curi *et al.* (2009), quienes mencionaron que no existe una asociación del SNP G530A con la terneza en diferentes grupos genéticos al encontrar una baja frecuencia del genotipo AA y la predominancia del genotipo GG.

Juszczuk-Kubiak *et al.* (2009) encontró que el SNP C357G se localiza en la región promotora del gen CAST y sugirieron que posiblemente esté tenga participación con la terneza de la carne, en ese trabajo se encontró la presencia de este SNP, sin embargo, los resultados demuestran que no tiene un efecto sobre la terneza de la carne. Por otro lado, es importante destacar que este es el primer reporte de la evaluación de este SNP en ganado de producción nacional, en donde se demuestra que no tiene una asociación con la terneza. Sin embargo, los datos de las distribuciones de frecuencias alélicas y genotípicas determinadas en esta población contribuyen al conocimiento de SNPs asociados a terneza y podrían ser de utilidad para otros estudios similares.

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto al SNP G1795A mostraron una frecuencia baja del genotipo AA, mientras que la mayor frecuencia se observó para el genotipo heterocigoto AG. Con respecto a las frecuencias alélicas, el alelo A mostró la mayor frecuencia, sin embargo, mediante el análisis de sustitución alélica se demostró que la presencia del alelo A no influyó significativamente sobre la terneza ($p > 0.05$), estos resultados difieren a lo reportado por Jiao *et al.* (2010) quienes analizaron siete subpoblaciones de ganado *Bos taurus* y encontraron una mayor frecuencia del alelo A en comparación con el alelo G, asociando al alelo A con el área del ojo del lomo y la capacidad de retención de agua en ganado bovino de la subespecie *Bos taurus*, lo que favorece a la terneza, además de establecer de que este SNP

podría considerarse como característico de ganado *Bos taurus*. Por el contrario, en este trabajo la mayor frecuencia del genotipo AA se observó en el grupo genético *Bos indicus*, por lo cual se sugiere que para la población analizada, la segregación del alelo favorable para las características de la calidad de la carne no es exclusivo de ningún grupo genético.

La presencia del genotipo AA del SNP G11181 sólo se encontró en el grupo genético *Bos indicus* lo cual coincide con lo reportado por Soria *et al.* (2009), quienes propusieron al SNP G1181 como candidato para un panel de marcadores moleculares asociados a los rasgos de la calidad de la carne en especial en el ganado *Bos indicus*, ya que la presencia del alelo A no fue identificado en el ganado *Bos taurus*. Por otro lado, el análisis de asociación con la terneza determinó que este SNP no presentó ninguna asociación con este rasgo, la ausencia de esta asociación se puede atribuir en parte, a que la región en donde se localiza este polimorfismo es una región no conservada entre grupos.

CONCLUSIONES

Los SNPs analizados no presentaron asociación alélica o genotípica con el rasgo de terneza, estos resultados refuerzan la importancia de hacer estos estudios de asociación de forma regional ya que la distribución de los genotipos entre las diversas subespecies que se comercializan es muy variable dependiendo del origen del ganado, de las diferentes poblaciones coexistentes y de la mezcla de distintas razas; lo anterior, aunando a mejoras en los registros de los parámetros productivos y reproductivos en las explotaciones ganaderas, contribuirá sin duda a una implementación exitosa de los programas de manejo asistido por marcadores moleculares, lo que dará como resultado una mejora en la selección de la calidad de la carne en beneficio a los productores.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Posgrado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal de la FES-Cuautitlán, UNAM, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al M en C. Manuel Andrés González Toimil de la FES-Cuautitlán, UNAM, al Dr. Pedro Garcés Yépez y al Dr. Celis e Ing. Celis del rancho Santa Rita.

FINANCIAMIENTO

Este estudio fue parcialmente financiado por la UNAM, FES- Cuautitlán a través de sus programas PIAP1837: "Aplicación de herramientas moleculares en el área agroalimentaria y diagnóstico de enfermedades mitocondriales", PAPIIT IN226419: "Asociación del fondo genético mitocondrial en enfermedades mitocondriales de la población mexicana" y la beca escolar otorgada a la autora a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ID 422754.

REFERENCIAS

Allais, S., Journaux, L., Levéziel, H., Payet-Duprat, N., Raynaud, P., Hocquette, J. F., Lepetit, J., Rousset, S., Denoyelle, C., Bernard-

Capel C., Renand, G. 2011. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of Animal Science*. 89 (1): 1–11. Doi: 10.2527/jas.2010-3063.

AMSA. 2015. Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation and Instrumental Tenderness Measurements of Meat. American Meat Science Association National Live Stock and Meat Board, Chicago, IL. USA.

Arango, G., J., Echeverri, Z., J., López, H., A. 2014. Asociación del gen de la hormona de crecimiento bovino con parámetros reproductivos en ganado Holstein. *Revista MVZ Córdoba*. 19 (3): 4249-4258.

Bang, M. L., Mudry, R. E., McElhinny, A. S., Trombitás, K., Geach, A. J., Yamasaki, R., Sorimachi, H., Granzier, H., Gregorio, C., Labeit, S. 2001. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *Journal of Cell Biology*. 153 (2): 413–427. Doi: 10.1083/jcb.153.2.413.

Bonilla, C. A., Rubio, M. S., Sifuentes, A. M., Parra, G. M., Arellano, V. W., Méndez, M. R.D., Berruecos, J. M., Ortiz, R. 2010. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genetics and Molecular Research: GMR*. 9 (4): 2395–2405. Doi: 10.4238/vol9-4gmr959.

Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P. L., Brenneman, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennett, G. L., Chase, C. C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*. 83 (1): 13–19. Doi: 10.2527/2005.83113x.

Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C., Johnson, D. D., Smith, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*. 84 (3): 520–525. Doi: 10.2527/2006.843520x.

Chung, H., Davis, M. 2012. Effects of genetic variants for the calpastatin gene on calpastatin activity and meat tenderness in Hanwoo (Korean cattle). *Meat Science*. 90 (3): 711–714. Doi: 10.1016/j.meatsci.2011.10.017.

Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Giusti, J., Silveira, A. C., Martins, C. L., De Oliveira, H. N. 2010. Assessment of GH1, CAPN1 and CAST polymorphisms as markers of carcass and meat traits in *Bos indicus* and *Bos taurus*-*Bos indicus* cross beef cattle. *Meat Science*, 86(4), 915–920. Doi:10.1016/j.meatsci.2010.07.016.

Curi, R. A., Chardulo, L. A. L., Mason, M. C., Arrigoni, M. D. B., Silveira, A. C., & De Oliveira, H. N. 2009. Effect of single nucleotide polymorphisms of CAPN1 and CAST genes on meat traits in Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and in their crosses with *Bos taurus*. *Animal Genetics*. 40 (4): 456–462. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01859.x.

De Souza, R. R. T., Chizzotti, M. L., Vital, C. E., Baracat, P. M. C., Barros, E., Busato, C. K., Aparecido, G. R., Machad, L. M., Martins, S. T. (2017). Differences in beef quality between Angus (*Bos taurus taurus*) and Nellore (*Bos taurus indicus*) cattle through a proteomic and phosphoproteomic approach. *PLoS ONE*, 12(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0170294.

Desgarennes, A., C. M., Del Moral, V., S., Meza, V., V. M., Peña, C., J. M., Zárate, M., J. P., Abad, Z., J. 2017. Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes CAPN1 Y CAST asociados a la calidad de la carne en bovinos de

- la Cuenca del Papaloapan. *Nova Scientia*, 9(19), 211. Doi: 10.21640/ns.v9i19.996.
- Eguiarte, L. E., Aguirre, J. A., Jardón, L., Aguirre, E., Souza, V. 2013. Genómica de Poblaciones: Nada en Evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la Evolución. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 16 (1): 42–56. Doi: 10.1016/s1405-888x(13)72077-1.
- Eivers, S. S., McGivney, B. A., Gu, J., MacHugh, D. E., Katz, L. M., Hill, E. W. 2012. PGC-1 α encoded by the PPARGC1A gene regulates oxidative energy metabolism in equine skeletal muscle during exercise. *Animal Genetics*. 43 (2): 153–162. Doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02238.x.
- Enriquez, V., C. E., Pereira, G. L., Malheiros, J. M., de Vasconcelos Silva, J. A. I. I., Albuquerque, L. G., de Oliveira, H. N., Loyola, C. L. A., Curi, R. A. 2017. Effect of the g.98535683A > G SNP in the CAST gene on meat traits of Nellore beef cattle (*Bos indicus*) and their crosses with *Bos taurus*. *Meat Science*. 123: 64–66. Doi: 10.1016/j.meatsci.2016.09.003.
- Hocquette, J. F., Lehnert, S., Barendse, W., Cassar-Malek, I., Picard, B. 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*. 1 (1): 159–173. Doi: 10.1017/S1751731107658042.
- IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. 2005. Statistical analysis of genetic polymorphisms in epidemiological studies. *Gaceta Sanitaria*. 19 (4): 333–341. Doi: 10.1157/13078029.
- Jiao, Y., Zan, L. S., Liu, Y. F., Wang, H. B., Guo, B. L. 2010. A novel polymorphism of the MYPN gene and its association with meat quality traits in *Bos taurus*. *Genetics and Molecular Research: GMR*. 9 (3): 1751–1758. Doi: 10.4238/vol9-3gmr906.
- Juszczuk-Kubiak, E., Flisikowski, K., Wicinska, K., Poloszynowicz, J., & Rosochacki, S. 2009. Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. *Meat Science*. 82 (2): 278–283. Doi: 10.1016/j.meatsci.2009.01.001.
- Knöll, R., Hoshijima, M., Chien, K. R. 2002. Z-line proteins: Implications for additional functions. *European Heart Journal. Supplement 4* (1). Doi: 10.1016/S1520765X(02)90105-7.
- Leal-Gutiérrez, J. D., Jiménez-Robayo, L. M., Ariza, M., Manrique, C., López, J., Martínez, C., Pinilla, Y., Castro, S., García, N., Bedoya, C., Jiménez, A. 2015. Polimorfismos de los genes CAPN1, CAST, DES, PRKAG3 y RYR1 asociados a la capacidad de retención de agua en crudo y cocinado en carne de bovino en cruces *Bos indicus* y *Bos taurus* en Colombia. *Archivos de Zootecnia*. 64 (245): 29–35. Doi: 10.21071/az.v64i245.371.
- Lenis, C., Ramos, L., Hernández Herrera, D., Álvarez, L. 2018. Polimorfismos de los genes calpaína y calpastatina en el ganado criollo colombiano Hartón del Valle. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*. 29 (3): 818. Doi: 10.15381/rivep.v29i3.14003.
- Li, J., Zhang, L. P., Gan, Q. F., Li, J. Y., Gao, H. J., Yuan, Z. R., Gao, X., Chen, J. B., Xu, S. Z. 2010. Association of CAST gene polymorphisms with carcass and meat quality traits in chinese commercial cattle herds. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 23 (11): 1405–1411. Doi: 10.5713/ajas.2010.90602.
- Li, X., Ekerljung, M., Lundström, K., Lundén, A. 2013. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Science*. 94 (2): 153–158. Doi: 10.1016/j.meatsci.2013.01.010.
- Lin, J., Handschin, C., Spiegelman, B. M. 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*. 1 (6): 361–370. Doi: 10.1016/j.cmet.2005.05.004.
- Mestroni, L. 2009, July 21. Phenotypic Heterogeneity of Sarcomeric Gene Mutations. A Matter of Gain and Loss?. *Journal of the American College of Cardiology*. 54 (4): 343–345. Doi: 10.1016/j.jacc.2009.04.029.
- Motter, M. M., Corva, P., Krause, M., Perez Cenci, M., Soria, L. 2009. Rol de la calpastatina en la variabilidad de la terneza de la carne bovina. *Journal of Basic and Applied Genetics*. 20 (1): 15–24.
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. [Consultado 6 Junio 2019] 2014. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5405210&fecha=26/08/2015.
- Page, B. T., Casas, E., Heaton, M. P., Cullen, N. G., Hyndman, D. L., Morris, C. A., Crawford, A. M., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Keele, J. W., Smith, T. P. L. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*. 80 (12): 3077–3085. Doi: 10.2527/2002.80123077x.
- Parra, B. G. M., Sifuentes, R. A. M., De la Rosa, R. X. F., Arellano, V. W. 2011. Avances y perspectivas de la biotecnología genómica aplicada a la ganadería en México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14 (3): 1025–1037.
- Rubio, L. M. de la S., Braña, V. D., Méndez, M. D., Torrescano U. G., Sánchez, E. A., Pérez, L. C., Figueroa, S. F., Delgado, S. E. 2013. Guía práctica para la estandarización y Evaluación de las Canales Bovinas mexicanas. 1ra. ed. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México, D.F.
- Sambrook, J., G. M. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (Vol. 1).
- Sifuentes, R. A.M., Puentes, M. H., Moreno, M. V.R., De la Rosa, R. X.F., Rosales, A. J. 2007. Frecuencia del alelo Q204X del gen Miostatina en hatos de Ganado del Noreste de México. *Técnica Pecuaria en México*. 45 (1): 85–92. Doi: 10.22319/rmcp.v45i1.1785.
- Sifuentes, R., María, A., Parra, B. M. G., De la Rosa, R. X. F., Sánchez, V. A., Serrano, M. F., Rosales, A. J. 2006. Importancia de las pruebas de paternidad basadas en microsatélites para la evaluación genética de ganado de carne en empadre múltiple. *Técnica Pecuaria En México*. 44 (3): 389–398.
- Soria, L. A., Corva, P. M., Branda Sica, A., Villarreal, E. L., Melucci, L. M., Mezzadra, C. A., Papaleo, M. J., Fernandez, M. G., Silvestro, C., Schor, A., Miquel, M. C. 2009. Association of a novel polymorphism in the bovine PPARGC1A gene with growth, slaughter and meat quality traits in Brangus steers. *Molecular and Cellular Probes*. 23 (6): 304–308. Doi: 10.1016/j.mcp.2009.07.007.
- Soria, L. A., Corva, P. M., Hugué, M. J., Miño, S., Miquel, M. C. 2010. Bovine μ -calpain (CAPN1) gene polymorphisms in brangus and brahman bulls. *BAG - Journal of Basic and Applied Genetics*, 21 (1): 61–69.

Valencia, D. C. E., y Zuluaga, J. J. E. 2013. Efecto del polimorfismo del gen de la somatotropina (BGH) sobre características lineales en vacas Holstein. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(1), 21–31.

Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D.E., Thomas, M. G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of Animal Science*. 85 (4): 891-900. DOI: 10.2527/jas.2006-512.

Zou, T., Mao, X., Yu, B., He, J., Zheng, P., Yu, J., Chen, D. 2014. Effects of dietary energy density and apparent ileal digestible lysine:digestible energy ratio on growth performance, meat quality, and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) gene expression of muscle and adipose tissues in Landrace \times Rongchan. *Livestock Science*. 167 (1): 219–226. Doi: 10.1016/j.livsci.2014.04.032.

Characterization and selection of native yeast isolated from natural fermentation for the production of the artisanal beverage bacanora

Caracterización y selección de levaduras nativas aisladas de la fermentación natural de la producción artesanal de la bebida bacanora

Maritza Lizeth Alvarez-Ainza^{1,2*}, Alfonso García-Galaz², Humberto González-Ríos³, Griselda Macrina Moreno-Ibarra¹, Mayra De la Torre-Martínez², Karina Alejandra Zamora-Quiñones², Evelia Acedo-Félix^{2,†}

¹ Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México.

² Coordinación de Ciencia de los Alimentos. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6, P.O. Box 1735, Hermosillo, Sonora, México.

³ Coordinación de Ciencia de los Alimentos de Origen Animal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera a la Victoria Km 0.6, P.O. Box 1735, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Bacanora is a Mexican distilled beverage made from agave, similar to tequila and mezcal, produced with an artisanal process. Therefore, the organoleptic characteristics of different bacanora vary highly. The aim of this study was to characterize and select native yeast involved in this artisanal process of fermentation. An initial pre-selection based upon the phenotypic characteristics of 580 strains of yeast was done, and then based on fermentation characteristics with agave juice. After pre-selection, three *Saccharomyces cerevisiae* and three non-*Saccharomyces* were chosen for the fermentative characterization. The *S. cerevisiae* yeasts produced 25.51 ± 1.19 g/L of ethanol at the end of the fermentation process, with a volumetric ethanol productivity of 1.76 ± 0.17 g/L/h, while for the three non-*Saccharomyces* strains the parameters were 15.56 ± 1.68 g/L and 0.484 ± 0.06 g/L/h, respectively. In the mixed culture of three *S. cerevisiae*, all remained at the end, but one of them predominates, and of the non-*Saccharomyces* yeasts, *Torulaspota delbrueckii* was the predominant yeast, according with PFGE results. The results showed that the native yeasts are adapted to the agave juice used for bacanora production, and these yeasts would contribute to improve the ethanol yields and the organoleptic characteristics of bacanora.

Keywords: Bacanora; alcoholic fermentation; native yeast; *S. cerevisiae*; non-*Saccharomyces*.

RESUMEN

Bacanora es una bebida Mexicana derivada de agave, similar al tequila o mezcal producida de manera artesanal, por lo que sus características organolépticas varían altamente entre bacanoras. El objetivo de este estudio fue caracterizar y seleccionar levaduras nativas involucradas en el proceso artesanal de fermentación. Se realizó una pre-selección inicial basada en las características fenotípicas de 580 levaduras, y después una selección basada en sus características fermentativas en jugo de agave. Después de la preselección se eligieron tres *S. cerevisiae* y tres no-*Saccharomyces*. Al evaluar las características fermentativas el cultivo con *Saccharomyces*

cerevisiae produjo al final de la fermentación, 25.51 ± 1.19 g/L de etanol, con una productividad volumétrica de etanol de 1.76 ± 0.17 g/L/h, mientras que para el cultivo con las levaduras de no-*Saccharomyces* se obtuvieron 15.56 ± 1.68 g/L y 0.484 ± 0.06 g/L/h respectivamente. En el cultivo mixto de *S. cerevisiae*, todas se mantuvieron al final, siendo una la predominante y en las levaduras no-*Saccharomyces*, *Torulaspota delbrueckii* fue la predominante esto según el seguimiento con PFGE. Las levaduras nativas están adaptadas al jugo de agave utilizado para la producción del bacanora y además pueden contribuir a mejorar el proceso fermentativo, así como, las características organolépticas sensoriales de esta exquisita bebida.

Keywords: Bacanora; fermentación alcohólica; levaduras nativas; *S. cerevisiae*; no-*Saccharomyces*.

INTRODUCTION

Bacanora is a Mexican distilled beverage made from agave, similar to tequila and mezcal. The organoleptic characteristics of the beverage vary highly from producer to producer, due to the artisanal process used for production (Nuñez, 2001; Aguirre-Rivera *et al.*, 2016). According to the Official Mexican Standards for bacanora, the drink must be made only from *Agave angustifolia* Haw and produced in the area of origin denomination for bacanora (AODB) (Alvarez-Ainza *et al.*, 2009; D.O.F., 2005). The process is similar for mezcal and tequila production. First, the agave core is cooked in ovens with mezquite-wood, to hydrolyze the inulin, then milled to obtain the must called "saite" and then fermented by native yeasts. Finally, fermented agave must be distilled and standardized to the particular touch of each producer (Moreno, 1998; Núñez, 2001; Yanez, 2003; De la Cruz, 2003).

From the Mexican distilled beverages from agave (tequila, mezcal and bacanora), only tequila batches keep a constant sensorial quality, since it is produced in large facilities with high technology. Mezcal and bacanora, on the other hand, have large variations in sensory quality, since they are produced using artisanal process and the spontaneous fermentation driven by the combined action of various species

*Autor para correspondencia: Maritza Lizeth Alvarez-Ainza
Correo electrónico: maritza.alvarez@unison.mx

Recibido: 12 de febrero de 2020

Aceptado: 25 de agosto de 2020

of yeasts and bacteria. Furthermore, only a specific specie of agave is used for production of tequila, another kind for bacanora, and several different species for mezcal (D.O.F., 2004; D.O.F., 2005; Aguirre-Rivera *et al.*, 2017). In the tequila industry, most companies use spontaneous fermentation, in many cases due to the natural-fermentation policy of the company. Different *S. cerevisiae* strains utilized for wine, beer or whisky fabrication, and even bakery yeast, are used as started in some tequila industries, although this yeast is able to ferment the tequila must, this is not the best suited to carry out this process (Gschaedler *et al.*, 2004).

Starter cultures are required for keeping the typical quality of wine, however, pure cultures of yeasts from the same area are more effective (Querol *et al.*, 2003). It is believed that these yeasts, called "selected local yeast", are better because they are completely adapted to the climatic conditions, the raw material and they are partially responsible of the unique characteristics of the beverage (Mas *et al.*, 2002; Querol *et al.*, 2003). For example, in the study of Wondra and Berovic (2001), 29 native *S. cerevisiae* strains were evaluated during wine making, and found that only one of these strains produced an excellent wine, while 11 wines did not have good quality. The main desirable phenotypic characteristics to select a yeast culture, is resistance to adverse factors such as high concentrations of ethanol and low pH. In addition, other desirable characteristics are a short lag phase during fermentation, complete consumption of fermentable sugars and glycerol, and production of killer toxins. On the other hand, undesirable characteristics are production of H₂S, volatile acids, and some of intermediate metabolites like acetaldehyde and pyruvate (Mas *et al.*, 2002).

In addition, several studies have identified the importance of *S. cerevisiae* due to the role that it has on the modification of beverages. This could be depending on the inoculation process in the case of wine (Heart & Fleet, 1983), or on how this yeast can be found at different points of tequila production (Lachance, 1995).

In another study, Alvarez-Ainza *et al.* (2015) observed a high variability between the *S. cerevisiae* yeast isolated in every one of the municipalities during the natural fermentations process on the bacanora production. Moreover, this study showed how some non-*Saccharomyces* yeasts exhibited *Saccharomyces*-like characteristics, which might have an important participation on the fermentation process. In relation to this, Arellano *et al.* (2008) evaluated the kinetic parameters and the formation of volatile compounds from native *S. cerevisiae* and *Kloeckera sp.* strains, isolated from agave juice from tequila production, and observed that all *S. cerevisiae* strains as well as *Kloeckera* species had a similar behavior, however, between these species the production of aromatic compounds was different. Furthermore, Alvarez-Ainza *et al.* (2013) evaluated the main compounds of bacanora produced in the area with origin denomination, and found a great variability in the products; they recommend the use of a correct yeast culture as started for the fermentation process, so this variability could be corrected. In a Lopez-Alvarez

et al. (2016) study, the fermentation process in the elaboration of tequila was evaluated, carried out by comparing an ethanol yield in a *Kluyveromyces marxianus* native strain and in a bakery strain of *S. cerevisiae*, the results showed that the *K. marxianus* strain reached 96 % yield.

These studies support the idea that the *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species play an important role in the fermentation process for tequila production, so they recommend the evaluation of mixed cultures. Therefore, the aim of this work was to select native yeast from a large group of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains isolated during the fermentation process of bacanora, and to evaluate the performance of the selected native yeast as started-mixed cultures for production of bacanora.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Strain

Two hundred and five *S. cerevisiae* strains and 375 non-*Saccharomyces* yeast strains isolated from the fermentation tank of bacanora facilities, at different stages during the production of this beverage, were used (Collection of the laboratory of Microbiology in the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Hermosillo, Sonora, México). The yeasts were stored at -70° C in a YEPD medium (yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L and dextrose 20 g/L) with 30 % (v/v) glycerol.

Analysis of some phenotypical characteristics of yeast

Utilization of 1 % (w/v) glucose, fructose and inulin was assessed according to García-Galaz *et al.* (2004). Growth at 37 and 42° C was evaluated in PDA (Potato Dextrose Agar, Difco) plates acidified with tartaric acid 10 % (w/v) and incubated 48 h (D.O.F., 2004). Tolerance to ethanol was evaluated according to Lachance (1995), using 3, 5, 8, 10, 15 and 20 % (v/v) ethanol. Growth at different pH was evaluated on PDA plates, the initial pH was adjusted with tartaric acid in a pH range from 2.5 to 7.5, in 0.5 increments, and incubated at 30° C for 48 h. H₂S production was evaluated on Bismuth Sulfite Agar (Difco) plates and incubating for 5 days at 30° C (Caridi *et al.*, 2002). Killer factor was also evaluated using the killer-sensitive strain CECT 1018 and the Killer strain CECT 1891 (Caridi *et al.*, 2002) as references. Yeasts were cultivated in YEPD broth 1.8 % (w/v), with fructose instead of glucose, absorbance at 600 nm was followed until stationary phase and the length of the lag phase was determined.

Evaluation of mixed cultures as starter for bacanora production

Juice from *Agave angustifolia* Haw. The juice from agave was obtained from the saite of a producer; the saite was mixed with water and all the juice was filtered and collected. The final sugar concentration was adjusted to 12° Brix (55±3 g/L reducing sugars) and stored at -10° C.

Pre-inoculum and inoculum. The selected *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* (*Torulasporea delbrucekii*, *Pichia membranefaciens* and *Kluyveromyces marxianus*) strains were

evaluated. Each strain was inoculated in diluted fermentation medium, from cultures of each yeast stored at -70°C in a YEPD medium, to obtain the pre-inoculum and the inoculum, the diluted agave juice (1:2 from an original of 12° Brix) was incubated for 12 h at 30°C in 500-mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of agave juice, with low stirring (200 rpm). Two inoculums were used, one with three strains of *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* key 46, *S. cerevisiae* 591 and *S. cerevisiae* 1101) and another with three species of non-*Saccharomyces* (*Torulasporea delbrucekii* key 1227, *Pichia membranefaciens* key 807 and *Kluyveromyces marxianus* key 251).

Fermentation. Juice from *Agave angustifolia* Haw was sterilized in the fermentation tank (121°C , 15 min), the sugar concentration was adjusted at 12° Brix. The agave juice was supplemented with ammonium sulfate (1 g/L). Fermentations were carried in 3 L bioreactor (Applikon, The Netherlands) at 30°C and 200 rpm, using 2.5 L of the agave juice; air was not supplemented. Yeast was inoculated to an initial concentration of 20,000,000 cells/mL. Two fermentations were performed for each culture. The fermentation course was followed for 24 h and sampling was performed every hour during the first 12 h and each 2 h the remaining 12 h.

Analytical methods

Biomass concentration was estimated by total count using a Neubauer chamber or dry weight. Total reducing sugar was determined in previously hydrolyzed ferment yeast-free must by DNS method (Miller, 1959). Viability was estimated after dying cells with methylene blue (Díaz-Montaño *et al.*, 2008; Segura-García *et al.*, 2015). Ethanol concentration was determined using an enzymatic method measurement in an YSI biochemical analyzer 2700 (Yellow Spring Instrument). Karyotype technique was determined by pulsed clamp electrophoresis (PFGE) according to Alvarez-Ainza *et al.*, (2015) with some modifications, using the zymoliasse-20T enzyme at the first step of the process to degrade the cell wall (25 µg/mL, Seikaguru Corporation). *S. cerevisiae* YPH80 was used as molecular weight (Molecular Weight log Biolabs Inc.). The gel was stained with ethidium bromide and photograph with a GelDoc camera (BioRad).

Statistics analysis

The phenotypic characteristics analysis was conducted by BioNumerics software (Applied Maths 1998-2002), using UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) and the DICE coefficient to obtain a dendrogram. The specific growth rate (μ), substrate consumed rate (r_s), ethanol production rate (r_p), biomass and ethanol yields ($Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$) as well as a maximal biomass production (X_{max}) kinetic parameters were obtained by fitting a three-parameter logistic model for the fermentation with *Saccharomyces*, and the Gompertz model for the fermentation with non-*Saccharomyces*, based on the highest predictive fit obtained (R^2), using the statistical package NCSS 2007 (Kaysville, Utah, USA). The three-parameter logistic model states that: $Y = A / (1 + B \cdot \text{EXP}(-CT))$, where Y is the number of organisms in a given time; EXP is

the exponential function; A is the asymptote; B denotes the displacement in the X axis; C is the growth rate, and T is time. The Gompertz model states that: $Y = A (\text{EXP}(-\text{EXP}(-B(T-C))))$, where Y is the response variable; EXP the exponential function; A, B, and C are the parameters of equation, and T is time.

RESULTS AND DISCUSSION

Analysis of some phenotypical characteristics of yeast

All *S. cerevisiae* strains fermented glucose and fructose, but only 43 % (88 strains) fermented inulin. Of the non-*Saccharomyces* yeast, 8.2 % did not ferment glucose, 7.4 % were unable to ferment fructose and 57.3 % could use inulin. Of the *S. cerevisiae* strains, 94 % were able to grow at 37°C and 64 % at 42°C , and for the non-*Saccharomyces* yeast 97.4 % were able to grow at 37°C and 95.8 % at 42°C . All yeasts were able to grow and resist ethanol concentrations in the range of 3-15 %, and 95 % of *S. cerevisiae* yeast, as well as 95.7 % of the non-*Saccharomyces* strains, were able to resist 20 % ethanol. Only 8 *S. cerevisiae* and 170 non-*Saccharomyces* strains were unable to grow at pH 2.5. Regarding H₂S production, 17 % of *S. cerevisiae* and 16.5 % of non-*Saccharomyces* yeast strains resulted positive. The killer phenotype was present only in three *Saccharomyces* yeasts, 14 were killer-sensible and 257 were killer-neutral.

The individual carbohydrate fermentation was performed in order to assess the ability of yeast strains to use these sugars individually. In this study, glucose, fructose and inulin, were assessed, which in theory are the agave juice sugars for the bacanora production (Aguirre-Rivera, *et al.*, 2017); when cooked, agave “piñas” hydrolyze the carbohydrate reserve, those are the predominating with other fructans identified as new fructans or agavins (Mancilla-Margalli and Lopez, 2006). The bacanora process is done by a thermal treatment, however during the cooking process, all the fructans present in the “piñas” cannot be hydrolyzed, therefore, we also assessed whether these yeasts strains ferment inulin. In this study, it is noted that not all the non-*Saccharomyces* used glucose with a fermentative process, it is well known that this species uses most the oxidative metabolism (Heard and Fleet, 1985; Ciani *et al.*, 2016a; Ciani *et al.*, 2016b). The yeast tolerance or ability to grow at 37 and 42°C was important because in the region where the beverage is produced, temperatures of up to 42°C are reached in summer, based on the reports for tequila and whisky fermentation (Díaz-Montaño *et al.*, 2008; Walker and Hill, 2016). Optimum temperature for most yeast is 30 - 35°C , but this temperature may increase by 2 or 3 degrees during the process, and in summer, it has been observed that during tequila fermentation temperatures up to 40°C are reached (Díaz-Montaño *et al.*, 2008). The yeast ability for ethanol tolerance was performed by the recommendations of Lachance (1995). In that work, most of the *Saccharomyces* strains resisted up to 11 % ethanol, and in the present work almost all yeasts resist 20 %. Moreover, in fermented musts of cane and agave juice between 4 and 6.5 % ethanol are reached, so the native strains involved in the process of developing bacanora have this great quality (Heard and Fleet, 1985). The

pH of the "saite" is between 5 and 6, in some cases even lower (Fraizer and Westhoff, 1998), so in this study the survival of yeast at different pH was determined. Moreover, this study also evaluated the H₂S production on each of the strains because it is non-desirable (Mas *et al.*, 2002; Caridi *et al.*, 2005). Some bacanora-producers state that the "saite" sulfur aroma (rotten eggs) during the fermentation generates economic losses, since the batch is discarded (personal communication with producers).

The killer phenotype was present only in three *S. cerevisiae* strains, 14 *S. cerevisiae* were killer-sensitive and the rest of the *S. cerevisiae* and all the non-*Saccharomyces* (257 strains) were killer-neutral. Figure 1 shows the corresponding dendrogram analysis result of the phenotypic characteristics, and it shows the suitable characteristics recommended by Alvarez-Ainza *et al.* (2009) for bacanora production. Cluster 8 has the suitable characteristics recommended and it is constituted by 40 yeasts, 30 of them are *S. cerevisiae*, and 10 are non-*Saccharomyces* strains. Killer phenotype might represent an antagonist mechanism between yeasts during spontaneous fermentation process (Romano *et al.*, 2003). The native populations might be a relatively high number of killer-resistant strains to the toxin and low presence of strains with killer-killer phenotype. Moreover, killer native populations in each area could put in interrogative the inoculation of a killer-sensitive strain selected to observe its best oenological characteristics. It is then recommended to select strains that show the killer-neutral or killer-killer phenotype, because it favors when are used as starter culture (Rodríguez *et al.*, 1998).

Figure 1 shows the results of the analysis performed by the BioNumerics program, where the coefficient Dice and UPGMA were used to obtain a dendrogram, where a group or cluster with the suitable characteristics recommended by Alvarez-Ainza *et al.* (2009) for the bacanora production, can be observed. This group is cluster 8, constituted by 40 yeasts, 30 of *S. cerevisiae* and 10 of non-*Saccharomyces* strains. After the analysis of the phenotypic characteristics, the growth curves analyses were done. These analyses showed that the latency phase was diverse in the different kinds of yeast, where the non-*Saccharomyces* show latencies phases of up to 5 hours and the *S. cerevisiae* strains show no more than 2.5 h. These results help to determinate the yeasts that are adapted to the medium with fructose, fermentable carbohydrate present in the agave juice (data not shown).

Later, three non-*Saccharomyces* yeasts with a latency phase under 2 h and different velocity of growth, were chosen for evaluation in mixed cultures. Likewise, 3 different species of non-*Saccharomyces* were chosen to be evaluated in mixed cultures: *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranaefaciens* and *Tolurasporea delbrueckii*.

Evaluation of mixed cultures as starter for bacanora production

The time course of the *Agave angustifolia* Haw juice fermentation with *Saccharomyces* or non-*Saccharomyces* strains mixed cultures is shown on Figure 2, and the

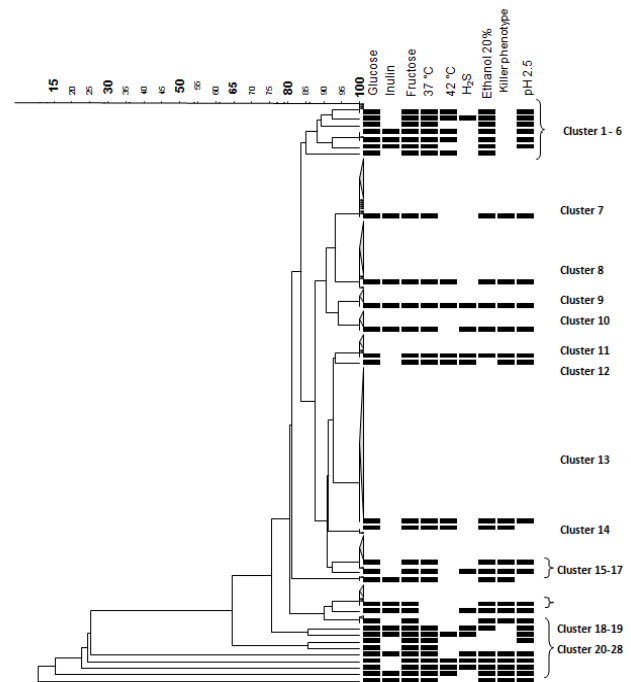


Figure 1. Phenotypic characteristics dendrogram of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts, obtained by the BioNumerics program using the coefficient Dice and UPGMA.

Figura 1. Dendrograma de las características fenotípicas de levaduras *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces* obtenido por el programa BioNumerics, utilizando el coeficiente Dice y UPGMA.

kinetic parameters on Table 1, where the P-value of the statistical analysis carried out with variance of kinetic parameters of the culture obtained using a logistic (*S. cerevisiae* culture) or Gompers model (non-*Saccharomyces* culture). The *Saccharomyces* mixed culture grew faster, and the maximal biomass had also greater numbers than the non-*Saccharomyces*, which yielded a maximal biomass of 8.27 ± 0.24 g/L, with reducing sugars depleted between 18-20 h. On the other hand, the mixed non-*Saccharomyces* strains culture yielded a maximum biomass of 3.87 ± 1.14 g/L and reducing sugars were not depleted.

The *Saccharomyces* mixed culture (*S. cerevisiae* key 46, *S. cerevisiae* 591 and *S. cerevisiae* 1101) was more efficient than non-*Saccharomyces* (*Torulasporea delbrueckii* key 1227, *Pichia membranaefaciens* key 807 and *Kluyveromyces marxianus* key 251) to produce ethanol. The first produced up to 25.51 ± 1.19 g/L with a volumetric productivity of 1.76 ± 0.17 g/L/h, while non-*Saccharomyces* strains produced 15.56 ± 1.68 g/L of ethanol with a volumetric productivity of 0.484 ± 0.06 g/L/h. The kinetic parameter evaluated in the fermentations on this study, indicates the degree of adaptation of the microorganisms to the culture. The yeasts in mixed cultures were able to grow and achieve transformation of sugars into ethanol; it should be noted here that in the case of mixed cultures, there is also competition between the inoculated strains and the best adapted will be the predominant.

Similar results were reported by Arellano *et al.* (2008),

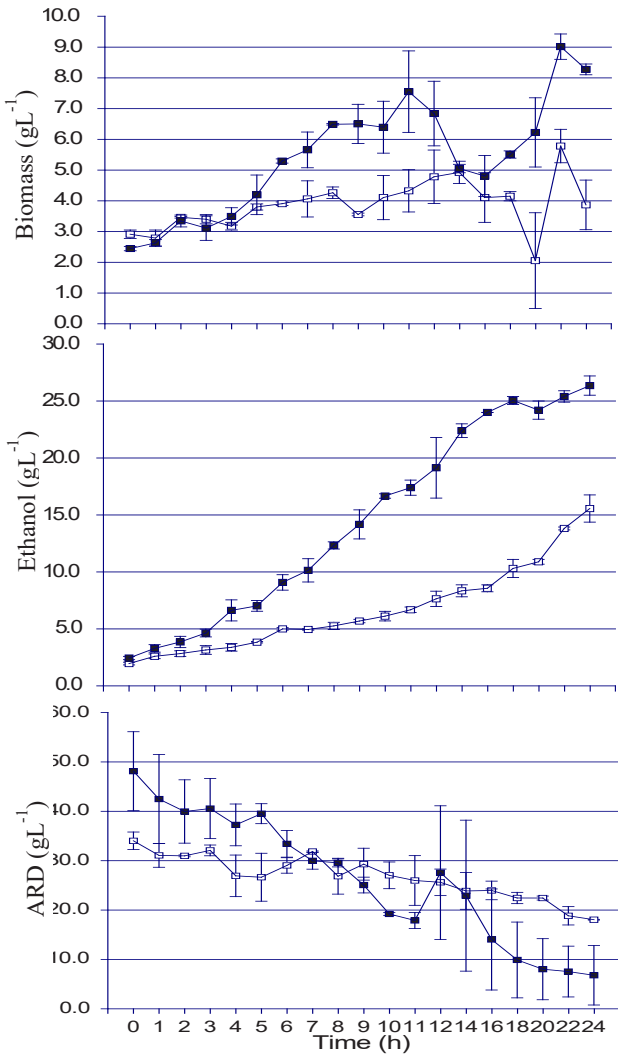


Figure 2. Fermentation kinetic profiles of cultures with *S. cerevisiae* (□) and non-*Saccharomyces* (■). ARD: reduction sugar concentration profile; Ethanol: ethanol concentration profile; Biomass: biomass concentration profile (Mean ± standard error).

Figura 2. Perfil cinético de la fermentación de cultivos de *S. cerevisiae* (■) y no-*Saccharomyces* (□). ARD: perfil de reducción de la concentración de azúcares; Etanol: perfil de la concentración de etanol; Biomasa: perfil de la concentración de biomasa. (Media ± error estándar).

they determined the kinetic parameters of wild yeast isolated from agave juice during tequila fermentation. In order to do this, they inoculated *S. cerevisiae* and *Kloeckera sp* isolates as monocultures in agave juice, and their results were in alcohol produced from 24 to 32 g/L being the *S. cerevisiae* specie the best alcohol producer. Similarly, Díaz-Montaño *et al.* (2008) study with *Agave tequilana* Weber juice, shows *S. cerevisiae* and *Kloeckera* with results between 21-43 g/L the etanol produced at the end.

Di Serio *et al.* (2003) evaluated bakery yeast on YEPD medium, and other medium made with molasses and different salts, reporting different results with respect to this study. Values reported by Di serio *et al.* (2003) on the maximum growth rate (1.26 ± 0.11 per h) and biomass yield per sub-

Table 1. Kinetics parameters of the fermentation of agave juice inoculated with mixed cultures of *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains.

Tabla 1. Parámetros cinéticos en la fermentación de jugos de agave inoculados con cultivos mixtos de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces*.

Parameter	<i>S. cerevisiae</i> mixed culture	Non- <i>Saccharomyces</i> mixed culture	P value
μ (per h)	0.29 ± 0.09	0.24 ± 0.06	0.6418
<i>rs</i> (g/L/h)	3.84 ± 0.12	1.03 ± 0.22	0.0008*
<i>rp</i> (g/L/h)	1.76 ± 0.17	0.48 ± 0.03	0.0000*
<i>Yx/s</i> (g/g)	0.07 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.0733
<i>Yp/s</i> (g/g)	0.45 ± 0.06	0.47 ± 0.03	0.8584
Biomass (g/L)	8.27 ± 0.24	3.86 ± 1.14	0.0331*
Total Alcohol (g/L)	25.5 ± 1.19	15.56 ± 1.68	0.0179*
Fermentation time (h)	18	>24	

μ : specific growth rate; *rs*, substrate consumed rate; *rp*, ethanol production rate; *Yx/s*, biomass yield; *Yp/s*, ethanol yield. Each value represents the average ± standard deviation of duplicate determinations of two fermentations. * Statistical difference: P < 0.05.

strate consumption (0.723 ± 0.069 g/g), are higher than our results. This means that the YEPD medium and the molasses are more complete than the agave juice, or that the agave juice has inhibitors that affect the yeast, like some maillard compounds produced in the agave cooking, such as furfural. On the other hand, the results obtained are encouraging because the Bacanora producer obtained less than 20 g/L of ethanol in their fermentations, and in longer time with mixed *S. cerevisiae* cultures the production was 27.5 % higher.

The karyotypes of the yeast found at the end of the fermentation with mixed cultures (Figure 3), show that using *S. cerevisiae*, the strain with the key 1101 predominated at the end, but the other two also developed. In the non-*Saccharomyces*-mixed culture, *Torulaspora delbrueckii* predominated, and some *Kluyveromyces marxianus* strains were occasionally found, while *Pichia membranefaciens* was not found at the end, probably because this yeast is most sensible to alcohol or other products generated in the process. The yeast of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species are often found in alcoholic fermentations, for the production of wine, whiskey and other agave beverages (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2003; Fiore *et al.*, 2005; Díaz-Montaño, 2008; Fleet, 2008; Walker and Hill, 2016). The participation of the adequate *Saccharomyces* yeast has an important impact in ethanol production during fermentation, while the non-*Saccharomyces* yeasts in the final aroma; *Torulaspora delbrueckii* can be used to modulate sensory characteristics, such as acidity (Bely *et al.*, 2008). Also, the use of *S. cerevisiae* is recommended to prevent native yeast growth on must, and the reduction of fermentation time (García *et al.*, 2017). García *et al.* (2017) found that sequential cultures have produced more different wines providing organoleptic properties associated with the non-*Saccharomyces* strains used. Nolasco-Cancino *et al.* (2018) evaluated *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in single and mixed cultures in maguey juice (*Agave angustifolia*) used for mezcal production; the authors con-

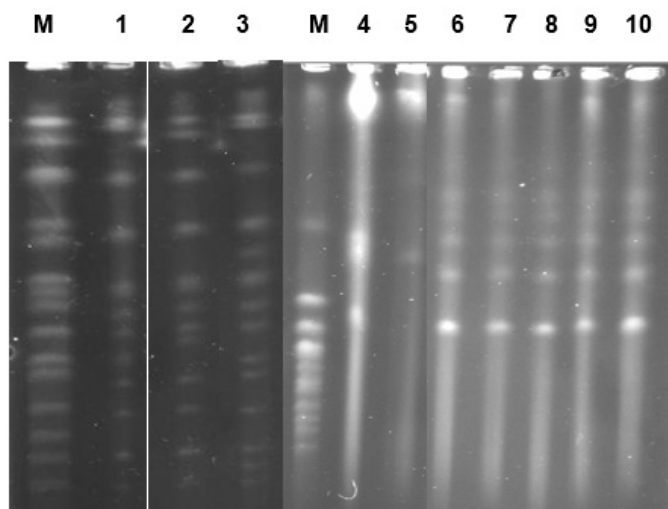


Figure 3. Karyotypes of yeasts found at the end of each culture probes fermentation.

M: molecular weight of *S. cerevisiae* YPH80; 1-3, *S. cerevisiae* strains isolated at the end of the fermentation; 4, *K. marxianus* control; 5, *P. membranefaciens* control; 6, *T. delbrueckii* control; 7-10, strains isolated at the end of the fermentation from the no-*Saccharomyces* culture.

Figura 3. Cariotipos de las levaduras encontradas al final de la fermentación de cada uno de los cultivos probados.

cluded that these cultures revealed their possible influence on volatile compound production, suggesting that the yeasts combination could contribute to improve the organoleptic characteristics of artisanal mezcal.

CONCLUSIONS

The native *S. cerevisiae* yeast isolated and selected from the *Agave angustifolia* Haw juice fermentation, can be used as starter mixed culture and the concentration of ethanol increases compared to the spontaneous fermentation in the production facility. Since *Torulasporea delbrueckii* ferments agave juice and predominated along the process in our study, it could be used together with *S. cerevisiae* to improve the fermentative process and enhance the sensory characteristics of bacanora but further studies are required.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank and devote this manuscript to Evelia Acedo-Felix† who made this work possible. The authors also thank to the producers involves in the Bacanora production, and Gutiérrez-Franco, L. E. by proofreading.

REFERENCES

- Aguirre-Rivera, J., Aldrete-Herrera, P., Alvarez-Ainza, M. et al. 2017. Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Estado del Arte publicado por AGARED, Red Temática Mexicana Aprovechamiento Integral Sustentable y Biotecnología de los Agaves. ISBN: 978-607-97548-5-3. [consultado 07 febrero de 2020]. Available from: <http://www.agared.org/libro-panorama-de-los-agaves>.
- Alvarez-Ainza, M., González-Ríos, H., González-León, A., Valenzuela-Quintanar, A. and Acedo-Félix, E. 2013. Quantification of major volatile compounds in artisanal Bacanora. *American Journal of Analytical Chemistry*. 4: 683-688.
- Alvarez-Ainza, M., Zamora-Quiñonez, K. and Acedo-Félix, E. 2009. Perspectivas para el uso de levaduras nativas durante la elaboración de bacanora. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 51: 58-63.
- Alvarez-Ainza, M., Zamora-Quiñonez, K., Moreno-Ibarra, G. and Acedo-Felix, E. 2015. Genomic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast associated with alcoholic fermentation of bacanora produced by artisanal methods. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 175: 2668-2676.
- Arellano, M., Pelayo, C., Ramírez, J. and Rodríguez, I. 2008. Characterization of kinetic parameters and the formation of volatile compounds during the tequila fermentation by wild yeast isolated from agave juice. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 35: 835-841.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I. and Dubourdieu, D. 2008. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 122(3): 312-320.
- Caridi, A., Cufari, A., Ramondino, D. 2002. Isolation and clonal pre-selection of enological *Saccharomyces*. *Journal of General Applied Microbiology*. 48: 261-267.
- Ceccato-Antonini, S., Tosta, C. and da Silva, C. 2004. Determination of yeast killer activity in fermenting sugarcane juice using selected ethanol-making strains. *Brazilian Archives Biology and Technology*. 47: 13-23.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G. and Romano, P. 2016a. Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in Microbiology*. 7(555): 1-7.
- Ciani, M., Morales, P., Comitini, F., Tronchioni, J., Canonico, L., Curiel, J., Oro, L., Rodriguez, A. and Gonzalez, R. 2016b. Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Frontiers in Microbiology*. 7(642): 1-13.
- Combina, M., Elia, A., Mercado, L., Catania, C., Ganga, A. and Martinez, C. 2005. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 99: 237-243.
- D. O. F. 1998. Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-mezcal-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. [consultado 07 febrero de 2020]. Available from: <http://www.colpos.mx/bancodennormas/noficiales/NOM-070-SCFI-1994.PDF>.
- D. O. F. 2004. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2004, Bebidas alcohólicas-tequila-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. [consultado 07 febrero de 2020]. Available from: <https://www.crt.org.mx/images/Documentos/NOM-006-SCFI-2005.pdf>.
- D. O. F. 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-168-SCTI-2004, Bebidas alcohólicas-Bacanora-especificaciones de elaboración, envasado y etiquetado. [consultado 07 febrero de 2020]. Available from: <https://dof.vlex.com.mx/vid/scfi-alcoholicas-bacanora-ensvasado-28151559>
- De la Cruz, C. 2003. Sembrar maguey y producir Bacanora en el rancho. *Revista Rancho*. 11: 22-23.
- Di Serio, M., Aramo, P., E. de Alteris, Tesser, R. and Santacesaria, E. 2003. Quantitative analysis of the key factors affecting yeast

- rowth. Industrial and Engineering Chemistry Research. 42 (21): 5109-5116.
- Díaz-Montaño, D., Délia, M., Estarrón-Espinoza, M. and Strehaiano P. 2008. Fermentative capability and aroma compound production by yeast strains isolated from *Agave tequilana* Weber juice. Enzyme and Microbial Technology. 42: 608-616.
- Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M., García-Maiquez, E., Uruburu, F. and Querol, A. 2001. Yeast populations dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. Applied Environmental and Microbiology. 67(5): 2056-2061.
- Fiore, C., Arrizon, J., Gschaedler, A., Flores, J. and Romano, P. 2005. Comparison between yeasts from grape and agave must for traits of technological interest. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22: 1141-1147.
- Fleet, G. 2008. Wine yeast for the future. FEMS Yeast Research. 8(7), 979-995.
- Frazier, W. and Westhoff, D. 1998. Microbiología de los Alimentos. España. Ed. Acirbia, S.A.
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Crespo, J., Cabellos, J. and Arroyo, T. 2017. Yeast monitoring of wine mixed or sequential fermentations made by native strains from D.O "Vinos de Madrid" using Real-Time quantitative PCR. Frontiers in Microbiology. 8(2520): 1-15.
- García-Galaz, A., Pérez-Morales, R., Díaz-Cinco, M. and Acedo-Félix, E. 2004. Resistance of *Enterococcus* strains isolated from pigs to gastrointestinal tract and antagonistic effect against *Escherichia coli* K88. Revista Latinoamericana de Microbiología. 34: 5-11.
- Gschaedler, M., Ramirez, J., Díaz, D., Herrera, J., Arellano, M., Arrizón, L. and Pinal, L. 2004. CIATEJ. Fermentación etapa clave en la elaboración de tequila, Chapter 4. In Ciencia y tecnología del Tequila Avances y Perspectivas. Pp. 62-120. In: Gschaedler MAC (ed) Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Guadalajara, Jalisco, México.
- Guillamón, J., Sabate, J. and Barrio, E. 1998. Rapid Identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. Archives of Microbiology. 169: 387-392.
- Heard, G., and Fleet, G. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. Applied and Environmental Microbiology. 50(3): 727-728.
- Lachance, M. 1995. Yeast communities in a natural tequila fermentation. Journal of Antonie Van Leeuwenhoek. 68: 151-160.
- Lopez-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., Campos-García, J. 2012. Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. Journal of Bioscience and Bioengineering. 113 (5): 614-618.
- Mancilla-Margalli, N.D. and Lopez M. 2006. Water-Soluble Carbohydrates and fructan structure patterns from *Agave* and *Dasyilirion* species. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 7832-7839
- Mas, A., Torija, M., Beltrán, G., Novo, M., Hierro, N., Poblet, M., Rozés, N. and Guillamón, J. 2002. Selección de Levaduras. Tecnología del Vino, Fermentos. 39-44. <http://www.alcion.es>
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426-428.
- Moreno, S. 1998. *Agave angustifolia*. La bacanora desde su origen hasta nuestros días. Una bebida sonorensis con calidad internacional. Instituto del medio ambiente y el desarrollo de Sonora (Imades). Revista Entorno. 2: 3-5.
- Núñez, L. 2001. La producción de mezcal Bacanora. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J., Wachter, C. and Ruíz-Teran, F. 2018. Predominant yeasts during artisanal mezcal fermentation and their capacity to ferment maguey juice. Frontiers in Microbiology. 9(2900):1-12.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M., del Olmo M. and Barrio, E. 2003. Adaptative evolution of wine yeast. International Journal of Food Microbiology. 86: 3-10.
- Rodríguez, L., Abad, D., Gómez, J., Casanova, J. and Lema, C. 1998. Fenotipo killer: Distribución en la comarca de la Ribiera sacra en las poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2: 33-37.
- Romano, P., Fiore, C., Paraggio, M., Caraso, M. and Capece, A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavor. International Journal of Food Microbiology. 86: 169-180.
- Segura-García, L., Taillandier P., Brandam C. and Gschaedler, A. Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. 2015. Food Science and Technology, 60 (1): 284-291.
- Walker, G., M. and Hill, A. 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of whisk(e)y. Beverages. 2(38): 1-15.
- Wondra, M. and Berovic, M. 2001. Analyses of aroma components of Chardonnay wine fermented by different yeast strains. Food Technology and Biotechnology. 39(2): 141-148.
- Yanez, G. 2003. El maguey de Bacanora (*Agave angustifolia*). Instituto del medio ambiente y el desarrollo de Sonora (Imades). Revista Entorno. 11: 5-11

Efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* A. Gray sobre aislados clínicos de *Candida glabrata*

Effect of the essential oil of *Chrysactinia mexicana* A. Gray on clinical isolates of *Candida glabrata*

Omar Medina-de la Cruz^a, Carlos Alberto Leal-Morales^b, Thuluz Meza-Menchaca^c, Larissa Guillen^d, Bertha Irene Juárez-Flores^e, Verónica Gallegos-García^{*a}

^a Facultad de Enfermería y Nutrición, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. Av. Niño Artillero No. 130. Zona Universitaria. C.P. 78240.

^b Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México. Noria Alta S/N. Col. Noria Alta. C.P. 36050.

^c Laboratorio de Genómica Humana, Facultad de Medicina, Universidad Veracruzana, Xalapa, México. Calle Médicos y Odontólogos S/N. Col. Unidad del Bosque. C.P. 91010.

^d Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores, Instituto de Ecología, A.C. (INECOL), Clúster Científico y Tecnológico BioMimic, Xalapa, México. Carretera Antigua a Coatepec No. 351. Col. El Haya. C.P. 91070.

^e Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México. Av. Dr. Manuel Nava Martínez No. 6. Zona Universitaria. C.P. 78210.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* A. Gray en aislados clínicos de *Candida glabrata*. Se obtuvo aceite esencial por arrastre de vapor de las flores, hojas y ramas secundarias de *C. mexicana*. Se realizó cromatografía de gases y espectrometría de masas para conocer la composición del aceite. Se hicieron ensayos con aislados clínicos de *C. glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae* (control), para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite. Los cultivos se incubaron en medio YPD líquido, 7 h en medio nuevo (fase logarítmica) o 3 h en medio recuperado de fase estacionaria (fase estacionaria) con el aceite y se realizaron ensayos de microdilución. Los principales tres compuestos del aceite fueron la piperitona (29.57%), eucaliptol (26.86%) y α -terpineol (14.65%). Las CMIs obtenidas fueron, a) fase estacionaria: *S. cerevisiae* (BY4741) 2.78 mg/mL y *C. glabrata* (CBS138), (NY66) y (AN400) 6.50 mg/mL y (NY62) 9.29 mg/mL; b) fase logarítmica: *S. cerevisiae* (BY4741) 3.71 mg/mL y *C. glabrata* (CBS138) 4.64 mg/mL, (NY66) 6.5 mg/mL, (AN400) 8.36 mg/mL, y (NY62) 18.5 mg/mL. Este trabajo constituye el primer reporte del efecto fungicida del aceite esencial de *C. mexicana* sobre hongos patógenos del humano como *C. glabrata*.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, Fungicida, Piperitona, *Asteraceae*, Microdilución

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the effect of the *Chrysactinia mexicana* A. Gray essential oil, on *C. glabrata* clinical isolates. The essential oil was obtained by steam entrainment of flowers, leaves and secondary branches of *C. mexicana*. Gas chromatography and mass spectrometry were performed to determine the oil composition. Logarithmic and stationary phase microdilution assays were performed with *Saccharomyces cerevisiae* and clinical isolates of *C. glabrata* to determine the Minimum Inhibitory Concentration

(MIC) of the oil. The cultures were incubated in liquid YPD medium, for 7 h in fresh medium (logarithmic phase) or 3 h in recovering medium (stationary phase), with the oil and microdilution tests were performed. The three main oil compounds identified were piperitone (29.57%), eucalyptol (26.86%) and α -terpineol (14.65%). The MICs obtained were, a) stationary phase: *S. cerevisiae* (BY4741) 2.78 mg/mL and *C. glabrata* (CBS138), (NY66) and (AN400) 6.50 mg/mL and (NY62) 9.29 mg/mL; b) logarithmic phase: *S. cerevisiae* (BY4741) 3.71 mg/mL and *C. glabrata* (CBS138) 4.64 mg/mL, (NY66) 6.5 mg/mL, (AN400) 8.36 mg/mL, and (NY62) 18.5 mg/mL. This work constitutes the first report of the fungicidal effect of the *C. mexicana* essential oil on human pathogenic fungi such as *C. glabrata*.

Keywords: *S. cerevisiae*, Fungicide, Piperitone, *Asteraceae*, Microdilution

INTRODUCCIÓN

Las infecciones fúngicas invasivas han aumentado desde la década de los 80's en pacientes inmunosuprimidos por trasplante o portadores del virus de inmunodeficiencia humana, personas con tratamiento de quimioterapia, y aquellos que reciben terapias prolongadas con antibióticos de amplio espectro son vulnerables al desarrollo de este tipo de micosis (Santos *et al.*, 2018).

Los microorganismos causantes de estas infecciones son las especies del género *Candida*, que forman parte de la microbiota y se localizan en la mucosa del tracto gastrointestinal, vagina e incluso la piel (Underhill y Ilijev, 2014). Al presentarse las condiciones que favorecen su desarrollo, pueden pasar de causar una infección mucocutánea a ocasionar una candidemia debido a su adaptabilidad a los diferentes microambientes del huésped (Eggimann *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2016).

Se han identificado más de 200 especies del género *Candida*, aunque alrededor de 31 producen enfermedades

*Autor para correspondencia: Verónica Gallegos García
Correo electrónico: veronica.gallegos@uaslp.mx

Recibido: 7 de abril de 2020

Aceptado: 11 de octubre de 2020

en el humano, de éstas más del 90 % de las infecciones son causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kruzei* y *C. tropicalis* (Eggimann *et al.*, 2003). *C. albicans* es la especie que se aísla con mayor frecuencia en pacientes, pero en los últimos años se incrementó el número de infecciones por *Candida* spp. (Magalhães *et al.*, 2015).

En Islandia, Finlandia, Noruega, Dinamarca, Estados Unidos de América y España *C. glabrata* se aísla de enfermos con candidemia en segundo lugar de frecuencia (Guinea, 2014). Un reporte en 2015 de la Secretaría de Salud sobre las Infecciones Asociadas a la Atención en la Salud (IAAS) de 378 unidades notificantes, reportó a *C. glabrata* dentro de los 20 principales agentes etiológicos de IAAS con 203 casos (SSA, 2015). Aunque, en México se carece de estudios epidemiológicos recientes y detallados que indiquen la prevalencia de *C. glabrata* en pacientes con candidemia (Pineda-Díaz *et al.*, 2017).

C. glabrata es un patógeno emergente que tiene un mayor nivel de resistencia a los medicamentos para su tratamiento a base de azoles y equinocandinas en comparación con *C. albicans* (Horn *et al.*, 2009). Las infecciones por *C. glabrata* se asocian con aumento en los días de estancia hospitalaria y por consecuencia a un mayor costo por su atención (Moran *et al.*, 2010).

Debido a la resistencia que tiene *C. glabrata* a los medicamentos, se ha propuesto el uso de plantas medicinales que se han utilizado para diferentes padecimientos (Mahilraján *et al.*, 2014). Entre los países que utilizan la medicina tradicional se encuentran China, Brasil, Cuba, India, Jordania y México, por la riqueza y diversidad de su flora la cual puede tener diversas aplicaciones biológicas (Bakkali *et al.*, 2008).

Existen reportes en plantas de la familia *Asteraceae* sobre la actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de éstas. Un ejemplo es *Chrysactinia mexicana* A. Gray a quien se le han atribuido efectos como: afrodisiaco, antiespasmódico, antidiarreico, diurético, tónico, antipirético, antiinflamatorio y antifúngico (Cárdenas-Ortega *et al.*, 2005; García-López *et al.*, 2017). Sobre la actividad antifúngica del aceite esencial de *C. mexicana* fue utilizado por Cárdenas-Ortega *et al.* (2005) sobre *Aspergillus flavus*, microorganismo fitopatógeno que afecta al maíz. También existen reportes de extractos acuosos y metanólicos de *C. mexicana* sobre aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis* (Alanís *et al.*, 2005; García-López *et al.*, 2017).

Sin embargo, no hay reportes del aceite esencial de *C. mexicana* sobre hongos patógenos como *C. glabrata*, además

es poco lo que se conoce sobre su posible mecanismo de acción, por lo tanto, es de interés evaluar el efecto del aceite esencial de esta planta sobre aislados clínicos de *C. glabrata* y de un hongo no patógeno de humanos como *Saccharomyces cerevisiae*, que es filogenéticamente más relacionado a *C. glabrata* (Castaño *et al.*, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados

Las cepas empleadas en este estudio se presentan en la Tabla 1. La identificación molecular de los aislados clínicos de *C. glabrata* se realizó por PCR de acuerdo a lo reportado en 2015 (Castaño *et al.*, 2015).

Medios de cultivo

Las células se cultivaron en medio de levadura estándar YPD (del inglés *Yeast extract-Peptone-Dextrose*). El medio líquido contenía 1% de extracto de levadura (BD Bioxon), 2% peptona (BD Bioxon) y 2% de glucosa (Fermont), el medio sólido se preparó al adicionar 2% agar (BD Bioxon).

Recolección de *C. mexicana*

C. mexicana (*Asteraceae*) en etapa de floración se recolectó en el mes de Julio del año 2016 en el camino a Guadalcázar municipio de San Luis Potosí en las coordenadas 22°36'30.2"N 100°26'50.2"O. El material vegetal fue autenticado con el código SLPM37571 y depositado en el herbario del Instituto de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Obtención del aceite esencial de *C. mexicana*

El material vegetal se secó a temperatura ambiente por 72 h, se separaron las flores, las hojas y las ramas secundarias; se trituraron y se realizó la molienda en seco para obtener una partícula de 1.75 mm para la homogenización de la muestra. El aceite esencial se extrajo por la técnica de destilación por arrastre de vapor, la técnica para separar el aceite esencial del agua floral fue la separación por densidades con un embudo de decantación (Cárdenas-Ortega *et al.*, 2005).

Cromatografía de gases y espectrometría de masas

Para el análisis de la composición química del aceite esencial de *C. mexicana* extraídos de una mezcla de flores, las hojas y las ramas secundarias por destilación, se utilizó un cromatógrafo de gases (Agilent 7890B) equipado con una columna ZB-5MSi (30 m X 0.25 mm ID X 0.25 µm) y acoplado

Tabla 1. Cepas de levaduras empleadas en este estudio.

Table 1. Yeast strains used in this study.

Cepa	Microorganismo	Origen/Descripción	Referencia
BY4741	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	(Baker-Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
CBS138	<i>C. glabrata</i>	ATCC2001	(Dujon <i>et al.</i> , 2004)
AN400	<i>C. glabrata</i>	Aislado clínico de hemocultivo	Este estudio
NY62	<i>C. glabrata</i>	Aislado clínico de urocultivo	Este estudio
NY66	<i>C. glabrata</i>	Aislado clínico de exudado vaginal	Este estudio

a un analizador de masas TQ 7000D Agilent Technologies. Como gas de arrastre se empleó helio a un flujo constante de 1.2 mL/min. Se inyectó 1 μ L de una dilución de la muestra (1 μ L de muestra en 199 μ L diclorometano grado HPLC, Sigma-Aldrich) en modo "split" (16.7 mL/min) con el inyector a 250°C.

Las condiciones cromatográficas iniciaron con una temperatura de 50°C por 2 min, y se incrementó la temperatura 15°C por min hasta alcanzar 280°C, manteniendo ésta temperatura por 10 min. La temperatura de la interfase y fuente del EM fueron 250°C y 230°C, respectivamente. La detección de analitos se hizo en modo de barrido total del espectro (scan) de 30 a 500- m/z con un detector de IE. La identificación de los analitos fue realizada con la librería NIST (National Institute of Standards and Technology) versión 2.0D, NIST/EPA/NIH (NIST05) y con el uso de estándares sintéticos.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria en la fase logarítmica o estacionaria de crecimiento del microorganismo con aceite esencial de *C. mexicana*

La CMI se determinó como la concentración más baja del aceite esencial de *C. mexicana* requerida para la inhibición completa del crecimiento de *C. glabrata* (Zore et al., 2011). A partir de un precultivo de *C. glabrata* de 48 h, se inocularon tubos falcon con 10 mL de medio YPD a una OD_{600nm} 0.5. El control contenía o no dimetilsulfoxido (DMSO) al 1.25 % del volumen final (D8418 Sigma-Aldrich) del diluyente del aceite esencial, y se adicionaron las diferentes concentraciones del aceite esencial de *C. mexicana* que fueron desde 0.92mg/mL hasta 18.5mg/mL ($\rho=0.9290$ g/cm³) dependiendo de la cepa.

Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación continua a 120 rpm durante 7 h en medio nuevo (fase logarítmica de crecimiento) o durante 3 h en medio recuperado de fase estacionaria (fase estacionaria de crecimiento), transcurrido el tiempo de incubación se determinó la densidad óptica y se ajustó a OD_{600nm} 0.5 en 1 mL de agua destilada estéril, posteriormente se lavaron las células y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 s y se realizaron ensayos de microdilución (Cuéllar-Cruz et al., 2008) en placas de 96 pocillos y una alícuota de 180 μ L se colocaron en cajas de petri con medio YPD agar durante 48 h.

Conteo de unidades formadoras de colonias

A partir del crecimiento observado de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en los ensayos de microdilución sobre YPD sólido fueron seleccionadas las diluciones donde el número de colonias eran contables y posteriormente de cada una de ellas se espatularon 25 μ L sobre el medio YPD sólido. Se incubaron durante 48 h a 28°C para posteriormente realizar el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

Análisis estadísticos

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism V.5. Para la comparación de los diferentes tratamientos en cada cepa se hizo la prueba estadística de Shapiro-Wilk para después realizar la prueba ANOVA de una vía considerando el conteo de UFC como la variable de respuesta. Para evaluar la

diferencia entre las medias de los grupos (IC=95 % y $p=0.05$) se utilizaron análisis post-hoc con la prueba de Tukey los cuales se presentan en las respectivas gráficas.

Predicción de los espectros de actividad para las sustancias

Se realizó un análisis *in silico* para la predicción de los espectros de actividad para las sustancias con los principales compuestos del aceite esencial para conocer el posible mecanismo de acción, con el software gratuitamente <http://www.way2drug.com/RA>. La estructura química se cargó con la herramienta de Marvin. Los resultados de la predicción muestran la estructura con los átomos numerados y una tabla con el espectro probable de la reacción de biotransformación. Este espectro se calcula mediante el software PASS, basado en el análisis SAR. La precisión promedio de la predicción en validación cruzada de LOO (IAP) es 0.86 mientras el valor este más cercano a 1 más posibilidad tiene de actuar de esa manera.

RESULTADOS

Composición del aceite esencial de *C. mexicana*

La composición química del aceite esencial de *C. mexicana* se muestra en la Tabla 2, en donde se identificaron 26 compuestos. El aceite se caracterizó por la presencia mayoritaria de cinco compuestos: piperitona (29.58 %), eucaliptol (26.86 %), α -terpineol (14.65 %), delta-3-careno (12.37 %) y linalool (3.56 %).

Efecto del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en la fase logarítmica de su crecimiento

Para la cepa de *S. cerevisiae* la CMI fue de 3.71 mg/mL, esta concentración es menor respecto a la utilizada en las cepas de *C. glabrata*. Para las cepas CBS138, NY66, AN400 y NY62 la CMI fue de 4.64 mg/mL, 6.5 mg/mL, 8.36 mg/mL y 18.5 mg/mL respectivamente (Figura 1).

Con base en el conteo de UFC, se realizó la prueba estadística de ANOVA para determinar la diferencia de las medias de las cepas utilizadas con las distintas concentraciones de aceite esencial en la fase logarítmica de crecimiento. Se observa que en todas las cepas utilizadas hay una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$) entre los controles con la CMI determinada por el crecimiento sobre agar sólido. En los controles sin y con diluyente no hay diferencia estadística (Figura 2).

Efecto del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en la fase estacionaria de su crecimiento

En la fase estacionaria de crecimiento se encontró que en *S. cerevisiae* la CMI fue 2.78 mg/mL, para la cepa CBS138 la CMI fue de 6.50 mg/mL esta concentración fue la misma que para la cepa NY66 y la cepa AN400, sin embargo, para el aislado clínico NY62 la CMI fue mayor con 9.29 mg/mL (Figura 3).

Los análisis estadísticos indican que entre el control sin diluyente y el que tenía DMSO al 1.25 % no hay una diferencia estadísticamente significativa, por lo cual, el diluyente

Tabla 2. Compuestos identificados mediante CG-EM en el aceite esencial de *C. mexicana*.

Table 2. Compounds identified by GC-MS in the *C. mexicana* essential oil.

No.	Compuestos	Tiempo de Retención (min)	Abundancia Área del pico (%)
1	alfa-pinene*	4.980	0.058
2	alfa-felandreno*	5.257	1.393
3	Camfeno	5.438	0.820
4	Benzaldehído	5.589	0.025
5	Sabineno	5.745	0.528
6	beta-pineno	5.820	0.473
7	Mirceno	5.949	0.474
8	alfa-terpineno	6.301	0.678
9	p-cimeno*	6.379	2.349
10	Eucaliptol*	6.497	26.863
11	Delta-3-careno	6.611	12.368
12	gamma-terpineno	6.762	0.469
13	Terpinoleno	7.138	0.198
14	Linalool*	7.210	3.564
15	Fenil acetato de metilo	8.072	0.209
16	Terpinen-4-ol	8.117	0.229
17	Alfa-terpineol*	8.236	14.654
18	Cis-3-hexenil isovalerato	8.639	0.064
19	Piperitona*	8.925	29.576
20	Indole	9.255	0.243
21	Metil antranilato	9.641	0.162
22	Eugenol	9.849	0.538
23	Cis-jasmone	10.142	0.412
24	beta-cariofileno	10.448	1.153
25	Valenceno	10.838	1.190
26	Acetato de guayilo	11.646	1.629

*Compuestos verificados con estándares

no afecta el crecimiento de las células. Un dato importante es que en todas las cepas hubo diferencia entre los controles y las concentraciones de aceite esencial de *C. mexicana* probados. Aunque para la cepa de *S. cerevisiae*, el aislado NY66 y el aislado NY62, la segunda concentración utilizada, ya no muestra diferencias estadísticas respecto a la concentración anterior probada (Figura 4).

Predicción de los espectros de actividad para las sustancias

Con base a la predicción de los espectros, se propone el siguiente mecanismo de acción con los compuestos mayoritarios (Figura 5). La piperitona fue el compuesto en mayor porcentaje en el aceite esencial que se encontró y que inhibe la actividad de la fosfatasa con un valor (Potencial Inhibidor)

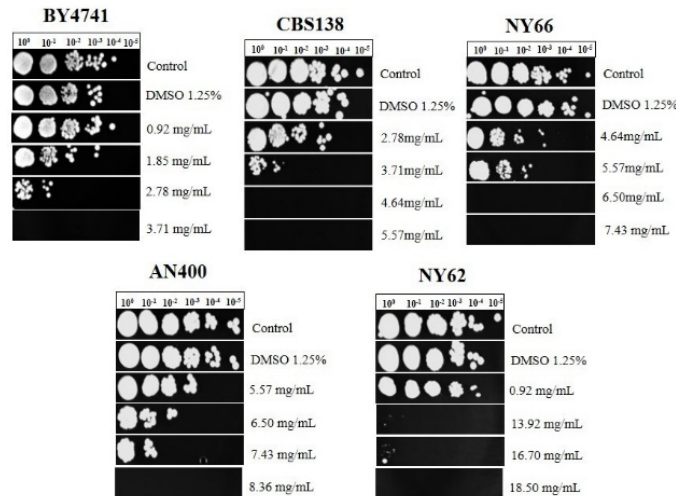


Figura 1. Efecto del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en la fase logarítmica de crecimiento. Ensayo de microdilución (10⁰ a la 10⁻⁵). BY4741: cepa de *S. cerevisiae*. Cepas de *C. glabrata*; CBS138: Cepa ATCC. NY66: aislado clínico de exudado vaginal. AN400: aislado clínico de hemocultivo. NY62: aislado clínico de urocultivo. Líneas: crecimiento de la cepa sin diluyente y sin aceite esencial (control), con diluyente (DMSO 1.25 %) y sin aceite esencial [controles]; con las diferentes concentraciones del aceite esencial (mg/mL). Incubación de 48 h sobre medio YPD agar a 28°C. Los ensayos se realizaron 5 veces.

Figure 1. Effect of *C. mexicana* essential oil on *S. cerevisiae* and *C. glabrata* growth at the logarithmic phase.

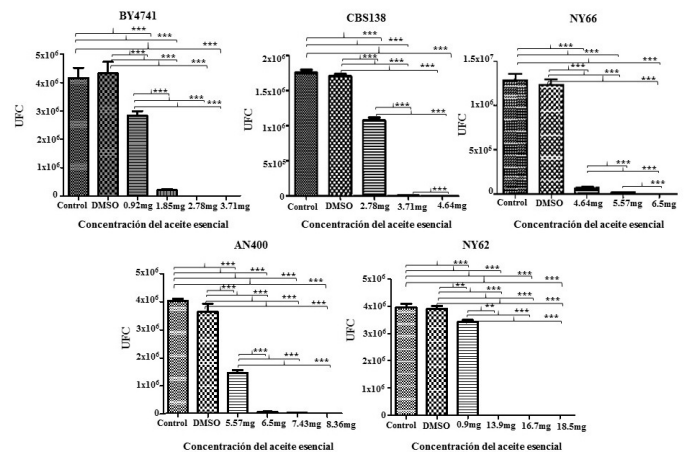


Figura 2. Análisis de ANOVA del efecto del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en fase logarítmica de crecimiento. BY4741: cepa de *S. cerevisiae*. Cepas de *C. glabrata*; CBS138: Cepa ATCC. NY66: aislado clínico de exudado vaginal. AN400: aislado clínico de hemocultivo. NY62: aislado clínico de urocultivo. En el eje de las X se observa las diferentes concentraciones del aceite esencial probadas, mientras que en el eje de las Y las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los ensayos se realizaron 5 veces. Los corchetes con asteriscos arriba de las barras se muestran solo en las comparaciones entre tratamientos que tuvieron diferencias significativas (***p*=0.01) o altamente significativa (***)*p*=0.001).

Figure 2. ANOVA analysis of the effect of *C. mexicana* essential oil on *S. cerevisiae* and *C. glabrata* growth at the logarithmic phase.

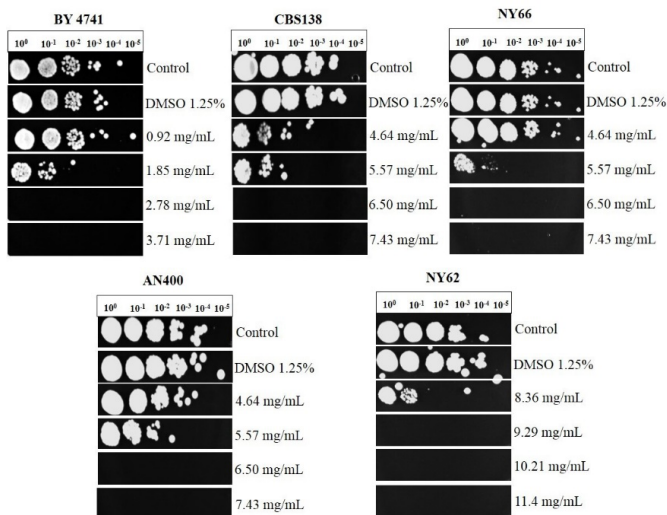


Figura 3. Efecto del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en fase estacionaria de crecimiento. Ensayo de microdilución (10^0 a la 10^5). BY4741: cepa de *S. cerevisiae*. Cepas de *C. glabrata*; CBS138: Cepa ATCC. NY66: aislado clínico de exudado vaginal. AN400: aislado clínico de hemocultivo. NY62: aislado clínico de urocultivo. Líneas: crecimiento de la cepa sin diluyente y sin aceite esencial (control), con diluyente (DMSO 1.25%) y sin aceite esencial [controles]; con las diferentes concentraciones del aceite esencial (mg/mL). Incubación de 48 h sobre medio YPD agar a 28°C. Los ensayos se realizaron 5 veces.

Figure 3. Effect of *C. mexicana* essential oil on *S. cerevisiae* and *C. glabrata* growth at the stationary phase.

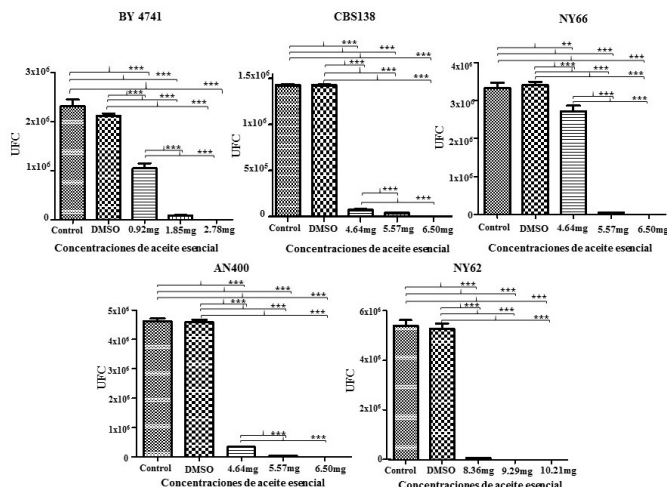


Figura 4. Análisis de ANOVA del efecto del aceite esencial de *C. mexicana* sobre *S. cerevisiae* y *C. glabrata* en fase estacionaria de crecimiento. BY4741: cepa de *S. cerevisiae*. Cepas de *C. glabrata*; CBS138: Cepa ATCC. NY66: aislado clínico de exudado vaginal. AN400: aislado clínico de hemocultivo. NY62: aislado clínico de urocultivo. En el eje de las X se observa las diferentes concentraciones del aceite esencial probadas, mientras que en el eje de las Y las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Los ensayos se realizaron 5 veces. Los corchetes con asteriscos arriba de las barras se muestran solo en las comparaciones entre tratamientos que tuvieron diferencias significativas (** $p=0.01$) o altamente significativa (***) $p=0.001$).

Figure 4. ANOVA analysis of the effect of *C. mexicana* essential oil on *S. cerevisiae* and *C. glabrata* in the stationary growth phase.

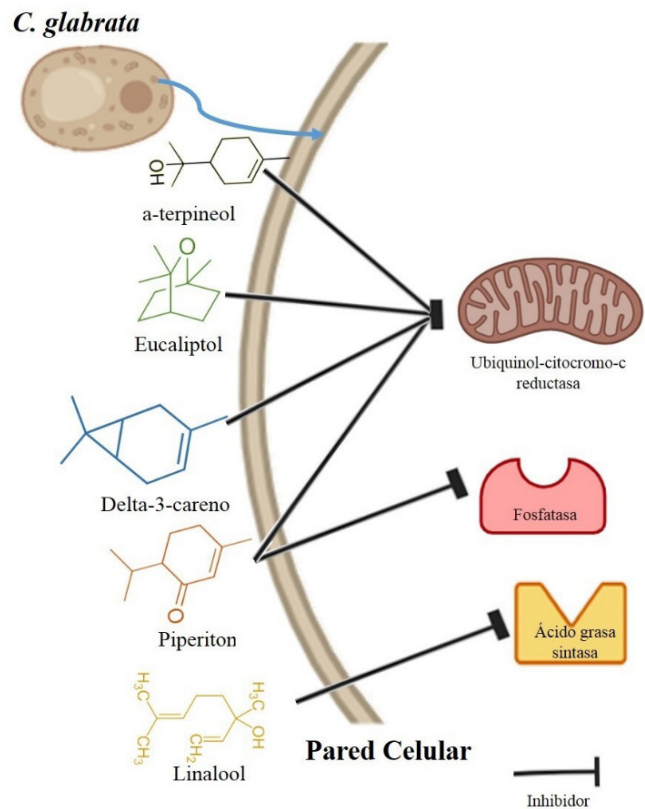


Figura 5. Mecanismo de acción propuesto de los principales compuestos del aceite esencial de *C. mexicana*. Se muestran los principales componentes piperitona, eucaliptol, linalool, delta-3-careno, α -terpineol y su posible efecto sobre las células de *C. glabrata* al pasar la pared celular. Como inhibidor de la enzima ácido graso sintasa se encuentra el linalool. Como inhibidor de la enzima fosfatasa el compuesto piperitona y el delta-3-careno. Como inhibidor de la Ubiquinol-citocromo-c reductasa se encuentran la piperitona, eucaliptol, delta-3-careno y el α -terpineol. Elaboración propia con el programa biorender.

Figure 5. Proposed mechanism of action of the main essential oil compounds of *C. Mexicana*.

PI=0.783, y que también tiene un efecto como probable inhibidor de la ubiquinol-citocromo-c reductasa con PI=0.873, al igual que el eucaliptol con un valor PI=0.760.

El linalool tiene un valor de PI=0.868 como inhibidor de la ácido graso sintasa, el delta-3-careno también inhibe la ubiquinol-citocromo-c reductasa con PI=0.800 al igual que el compuesto α -terpineol con un PI=0.775.

DISCUSIÓN

Se ha demostrado que aislados clínicos de *C. glabrata* presentan resistencia moderada a los azoles y equinocandinas, estos pueden volverse más resistentes después del uso de los fármacos (Jiang *et al.*, 2013). Aunque la información del mecanismo de acción de los aceites esenciales en hongos es limitada en comparación con los reportes en bacterias, se ha señalado que la actividad de los aceites esenciales en levaduras se debe al daño ocasionado en alguno de los sistemas enzimáticos involucrados en la producción de

energía y síntesis de componentes de la estructura celular (Hyldgaard *et al.*, 2012; Nazzaro *et al.*, 2013).

Las concentraciones del aceite esencial de *C. mexicana* para inhibir el crecimiento de *S. cerevisiae* y *C. glabrata* son mayores que las reportadas por Cárdenas-Ortega *et al.* (2005) para *Aspergillus flavus*, una posible explicación es que la metodología utilizada es diferente ya que en ese estudio utilizaron el método de difusión en agar. Además, se ha planteado que los mamíferos como el ser humano son altamente resistentes a enfermedades fúngicas invasivas como la provocada por *C. glabrata* de allí que los microorganismos fúngicos patógenos del ser humano sean más resistentes a los medicamentos que los fitopatógenos ya que deben cumplir cuatro criterios: 1) poder crecer a altas temperaturas (>37°C); 2) penetrar las barreras de los tejidos del huésped; 3) digerir y absorber componentes de los tejidos humanos y la más importante 4) evadir y resistir el sistema inmune humano (Köler *et al.*, 2015). Es importante mencionar que *S. cerevisiae* es una levadura que no ocasiona enfermedades en el ser humano, sin embargo, es más cercana filogenéticamente a *C. glabrata* que a *C. albicans*.

La CMI de aceite esencial de *C. mexicana* en la cepa CBS138 durante la fase estacionaria fue más elevada que en fase logarítmica, lo anterior coincide con lo reportado por Jakubowski *et al.* (2000) quienes determinaron que las bacterias y hongos en la fase estacionaria son más resistentes al estrés oxidativo. Lo anterior se debe a que utilizan diferentes mecanismos enzimáticos en comparación con la fase logarítmica, ya que una vez que la célula entra en fase estacionaria deja de dividirse y la actividad metabólica se reduce, además de que activa distintas rutas metabólicas mediante genes que codifican para enzimas antioxidantes como catalasas, super-óxido dismutasa y síntesis de glutatión (Jakubowski *et al.*, 2000).

La concentración del aceite esencial utilizada en los aislados clínicos AN400, NY62 y NY66 fue diferente con relación a las cepas de referencia (laboratorio), ya que las CMIs en los aislados fue mayor en fase logarítmica que en fase estacionaria de su crecimiento, una posible explicación es que al utilizar cepas de *Candida* adaptadas al laboratorio estas se han subcultivado en varias ocasiones e incluso por décadas en algunos casos desde su primer aislamiento, por lo tanto, pueden ser un no representante adecuado para las cepas clínicamente relevantes en la actualidad esto se ha observado en la formación de biofilms (Alnuaimi *et al.*, 2013). Se ha demostrado también que la microevolución de los hongos como *C. glabrata* puede ocurrir bajo condiciones de crecimiento *in vitro* e *in vivo* y de esta manera afectar los principales factores de virulencia (Franzot *et al.*, 1998; Brunke *et al.*, 2014).

Otra posible respuesta es que los aislados clínicos de *C. glabrata* muestran cariotipos variables porque su genoma se reorganiza con frecuencia y se considera que éstos reordenamientos son el principal mecanismo de adaptación de este microorganismo (Ahmad *et al.*, 2014). Las aneuploidías en estos aislados clínicos sugieren variaciones en la organi-

zación de los cromosomas y el número de copias de éstos son un mecanismo utilizado para generar rápidamente una respuesta a condiciones estresantes de crecimiento como la exposición a los antifúngicos, en este caso al aceite esencial (Selmecki *et al.*, 2010).

Entre aislados clínicos existe variación en el tamaño de los cromosomas, sin dejar de lado la capacidad que posee *C. glabrata* para formar nuevos cromosomas cuyo origen son las duplicaciones segmentarias; éstos nuevos cromosomas llevan genes duplicados en su mayoría de la familia de transportadores ABC que desempeñan un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos (Poláková *et al.*, 2009). Esto pudiera ser una posible explicación de por qué los aislados clínicos probados en este experimento son susceptibles a diferentes concentraciones del aceite esencial, aunque se deben realizar más investigaciones para poder determinarlo.

López-Fuentes *et al.* (2018) mencionan que la variabilidad del genoma de *C. glabrata* le confiere un patrón único de expresión de proteínas que se encuentran asociadas a la pared celular. Aislados clínicos de un paciente a menudo muestran 2 o 3 cariotipos diferentes y durante la infección el patrón cromosómico puede sufrir cambios en varios días. En *C. glabrata* las duplicaciones segmentarias, los reordenamientos cromosómicos y los cromosomas adicionales ocurren y persisten con alta frecuencia, así la elevada dinámica cromosómica no es compatible con el estilo de vida sexual y la meiosis, pero beneficia la adaptación a las condiciones ambientales cambiantes.

Algunas propuestas del mecanismo de acción de aceites esenciales son: 1) El sinergismo que producen todas las moléculas de los aceites, produce el efecto fungicida, aunque algunos investigadores como Ipek *et al.* (2005) debaten que esto solo refleja el efecto de las principales moléculas que lo componen; 2) otro grupo de investigadores como Santana-Rios *et al.* (2001) y Hoet *et al.* (2006) sugieren que la actividad de los componentes mayoritarios está modulada por moléculas que se encuentran en un menor porcentaje y que es posible que varios componentes del aceite esencial le otorguen diferentes funciones: como el olor, la densidad, la textura, el color y sobre todo la capacidad de penetración celular y la forma en que se distribuye intracelularmente. Por lo tanto, habría que probar los compuestos por separado para poder confirmar alguna de las hipótesis.

Al realizar la predicción de los espectros de actividad para el eucaliptol, piperitona, delta-3-careno y el α -terpineol, se encontró que funcionan como posibles inhibidores de la ubiquinol-citocromo-c reductasa, la alteración de este gran complejo altera el estado redox de las células. Hoehamer *et al.* (2010) observaron que para *C. albicans* en interacción con agentes antifúngicos como azoles, polienos y equinocandinas muestran un cambio en el proteoma, por su interacción con éstos compuestos algunas proteínas se ven alteradas como la ubiquinona-citocromo-C-reductasa y comprometen el adecuado funcionamiento de las células.

La piperitona se encontró que actúa como un inhibidor de la enzima fosfatasa, la vía de transducción del fosfato

en *C. glabrata* es similar que la de *S. cerevisiae*, esta ruta es esencial para sobrepasar la inanición (Orkwis *et al.*, 2010). El linalool funciona como un posible inhibidor de la ácido graso sintasa, la cual es muy importante porque está implicada en la síntesis de ácidos grasos de la pared celular. La cantidad de ácidos grasos sintetizados varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento del microorganismo, además, en los hongos la síntesis de novo de ácidos grasos sucede en el citosol o en las mitocondrias (Roche *et al.*, 2013).

Freisleben y Jäger proponen que el efecto antifúngico de los aceites esenciales puede ser por que alteran la estructura y función de la pared celular, así como las membranas de algunos organelos y la inhibición de proteínas o material nuclear (Freisleben y Jäger, 2014). Por otro lado, se ha demostrado que algunos aceites esenciales como el del árbol de té, *Litsea cubeba* y *Anethum graveolens*, actúan sobre *C. albicans* al alterar la permeabilidad y la fluidez de la pared celular, de esta manera se comprometen funciones asociadas a esta como la inhibición de ergosterol; esto los convierte en un posible potencial tratamiento. También pueden alterar el ciclo Krebs y la inhibición de la síntesis del ATP en las mitocondrias (Nazzaro *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

El aceite esencial de *C. mexicana* es un posible potencial antifúngico, sin embargo, se debe ampliar la investigación para poder determinar la toxicidad en células del ser humano y de esta manera poder evaluar su uso de manera local o sistémica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos amablemente a la Dra. Irene Castaño Navarro y al Dr. Alejandro De las Peñas Nava del Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología por su apoyo en la donación de las distintas cepas de *C. glabrata* utilizadas en esta investigación. L.G. agradece el apoyo técnico de Mónica Navarro.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses con respecto a los datos de esta publicación.

FUENTE DE FINANCIACIÓN

La presente investigación no ha recibido ninguna beca específica de agencias de los sectores público, comercial, o sin ánimo de lucro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alanis, A.D., Calzada, F., Cervantes, J.A., Torres, J.A., Torres, J. y Ceballos, G.M. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 100(1-2): 153-157.
- Alnuaimi, A.D., O'Brien-Simpson, N.M., Reynolds, E.C. y McCullough, M.J. 2013. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS Yeast Research*. 13(7): 689-699.
- Ahmad, K.M., Kokošar, J., Guo, X., Gu, Z., Ishchuk, O.P. y Piškur, J. 2014. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*. 14(4): 529-535.
- Bakkali, F., Averbeck, S. y Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46(2): 446-475.
- Baker-Brachmann, C., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., *et al.* 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*. 14(2): 115-132.
- Brunke, S., Seider, K., Fischer, D., Jacobsen, I.D., Kasper, L., Jablonowski, N., *et al.* 2014. One small step for a yeast-microevolution within macrophages renders *Candida glabrata* hypervirulent due to a single point mutation. *Plos Pathogens*. 10(10): e1004478.
- Cárdenas-Ortega, N.C., Zavala-Sánchez, M.A., Aguirre-Rivera, J.R., Pérez-González, C. y Pérez-Gutiérrez, S. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(11): 4347-4349.
- Castaño, I.B., Cormack, B. y De Las Peñas, A. 2006. Virulencia del hongo patógeno oportunista *Candida glabrata*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48(2): 66-69.
- Castaño, I.B., Cuéllar-Cruz, M. y De Las Peñas, A. 2015. Método in vitro para la detección de *Candida glabrata*, kit de diagnóstico y uso de los mismos. *México. EP2410052B1*.
- Cuéllar-Cruz, M., Briones-Martin-del-Campo, M., Cañas-Villamar, I., Montalvo-Arredondo, J., Riego-Ruiz, L., Castaño, I., *et al.* 2008. High resistance to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida glabrata* is mediated by a single catalase, Cta1p, and is controlled by the transcription factors Yap1p, Skn7p, Msn2p, and Msn4p. *Eukaryotic Cell*. 7(5): 814-825.
- da Silva, A., Lee, K.K., Raziunaite, I., Schaefer, K., Wagener, J., Yadav, B., *et al.* 2016. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 34: 111-118.
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S. y Lafontaine, I. 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature*. 430: 35-44.
- Eggimann, P., Garbino, J. y Pittet, D. 2003. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*. 3(11): 685-702.
- Franzot, S.P., Mukherjee, J., Cherniak, R., Chen, L.C., Hamdan, J.S. y Casadevall, A. 1998. Microevolution of a estándar strain of *Cryptococcus neoformans* resulting in differences in virulence and other phenotypes. *Infection and Immunity*. 66(1): 89-97.
- Freisleben, S.H. y Jäger, A.K. 2014. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanisms—a review. *Medicinal and Aromatic Plants*. 3(2): 1-6.
- García-López, J.C., Álvarez-Fuentes, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Jasso-Pineda, Y., Contreras-Treño, H. I., Camacho-Escobar, M. A. *et al.* 2017. Anti-inflammatory Effects of *Chrysactinia mexicana* Gray Extract in Growing Chicks (*Gallus gallusdomesticus*) Challenged with LPS and PHA. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(1): 550-562.
- Guinea, J. 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 20: 5-10.

- Hoehamer, C.F., Cummings, E.D., Hilliard, G.M. y Rogers, P.D. 2010. Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole, polyene, and echinocandin antifungal agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54(5): 1655-1664.
- Hoet, S., Stevigny, C., Hérent, M.F. y Quetin-Leclercq, J. 2006. Antitrypanosomal compounds from the leaf essential oil of *Strychnos spinosa*. *Planta Medica*. 72(5): 480-482.
- Horn, D.L., Neofytos, D., Anaissie, E.J., Fishman, J.A., Steinbach, W.J., Olyaei, A.J., *et al*. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical Infectious Diseases*. 48(12): 1695-1703.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T. y Meyer, R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*. 3: 12.
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B.A., Kurkcuoglu, M. y Baser, K.H.C. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by *Ames Salmonella/microsomal* test. *Food Chemistry*. 93(3): 551-556.
- Jakubowski, W., Biliński, T. y Bartosz, G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(5): 659-664.
- Jiang, C., Dong, D., Yu, B., Cai, G., Wang, X., Ji, Y., *et al*. 2013. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(4): 778-785.
- Köler, J.R., Casadevall, A. y Perfect, J. 2015. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 5(1): a019273.
- López-Fuentes, E., Gutiérrez-Escobedo, G., Timmermans, B., Van Dijck, P., De Las Peñas, A. y Castaño, I. 2018. *Candida glabrata's* genome plasticity confers a unique pattern of expressed cell wall proteins. *Journal of Fungi*. 4(2): 67.
- Magalhães, Y.C., Bomfim, M.R.Q., Melônio, L.C., Ribeiro, P., Cosme, L.M., Rhoden, C.R., *et al*. 2015. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46(1): 117-123.
- Mahilraj, S., Nandakumar, J., Kailayalingam, R., Manoharan, N.A. y SriVijeindran, S. 2014. Screening the antifungal activity of essential oils against decay fungi from palmyrah leaf handicrafts. *Biological Research*. 47(1): 35.
- Moran, C., Grussemeyer, C.A., Spalding, J.R., Benjamin, D.K. y Reed, S.D. 2010. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. *American Journal of Infection Control*. 38(1): 78-80.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R. y De Feo, V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 6(12): 1451-1474.
- Orkwis, B.R., Davies, D.L., Kerwin, C.L., Sanglard, D. y Wykoff, D.D. 2010. Novel acid phosphatase in *Candida glabrata* suggests selective pressure and niche specialization in the phosphate signal transduction pathway. *Genetics*. 186(3): 885-895.
- Pineda-Díaz, J., Gómez-Meraz, Y., Xoconostle-Cázares, B. y García-Mena, J. 2017. Detección de *Candida glabrata* en mujeres mexicanas sanas y con candidiasis vulvovaginal recurrente. *Ginecología y Obstetricia de México*. 85(2): 71-79.
- Poláková, S., Blume, C., Zárate, J.A., Mentel, M., Jørck-Ramberg, D., Stenderup, J., *et al*. 2009. Formation of new chromosomes as a virulence mechanism in yeast *Candida glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(8): 2688-2693.
- Roche, C.M., Blanch, H.W., Clark, D.S. y Glass, N.L. 2013. Physiological role of acyl coenzyme A synthetase homologs in lipid metabolism in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell*. 12(9): 1244-1257.
- Santana-Rios, G., Orner, G.A., Amantana, A., Provost, C., Wu, S.-Y. y Dashwood, R.H. 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 495(1): 61-74.
- Santos, S.B.D., Sabadin, C.E.S., Mario, D.N., Rigo, L. y Barbosa, D.A. 2018. Presence of *Candida* spp. and candidiasis in liver transplant patients. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 93(3): 356-361.
- Secretaria de Salud. 2015. Informe Anual 2015: Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/212974/infoanual_rhove_2015.pdf México. (Accesado 04/06/2020).
- Selmecki, A., Forche, A. y Berman, J. 2010. Genomic plasticity of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 9(7): 991-1008.
- Underhill, D.M. y Iliev, I.D. 2014. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nature Reviews Immunology*. 14(6): 405-416.
- Zore, G.B., Thakre, A.D., Jadhav, S. y Karuppayil, S. M. 2011. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 18(13): 1181-1190.

Influencia del nivel nutricional sobre la calidad seminal y el comportamiento sexual de los machos cabríos tratados con días largos artificiales

Influence of nutritional level on seminal quality and sexual behavior of male goats treated with artificial long days

Manuel de Jesús Flores Nájera^{a*}, Cesar Augusto Rosales Nieto^b, Leonardo Iván Vélez Monroy^a, Adán Ulises Chávez Solís^c

^a Campo Experimental La Laguna. INIFAP. Blvd. José Santos Valdés Núm. 1200 Pte. C.P 27440. Matamoros, Coahuila, México.

^b Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Autónoma de San Luis. Ejido Palma de la Cruz S/N. Soledad de Graciano Sánchez. C.P 78321. San Luis Potosí, México.

^c Campo Experimental Bajío. INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5. C.P 38010. Celaya, Guanajuato, México.

RESUMEN

Para evaluar si el nivel nutricional modifica la calidad seminal y el comportamiento sexual de los machos cabríos tratados con días largos artificiales. Diez y seis machos cabríos fueron divididos en dos tratamientos difiriendo en su nivel alimenticio. Un grupo de machos recibió el 75 % de sus requerimientos nutricionales de mantenimiento y reproducción (G-75; n=8), mientras que otro grupo recibió el 120 % (G-120; n=8). La circunferencia escrotal fue menor en el grupo G-75 que la registrada en el grupo G-120 ($P < 0.01$). Similarmente, el volumen de eyaculado y el número total de espermatozoides por eyaculado fueron menores en el grupo G-75 (0.5 ± 0.05 mL y 1.9×10^9 , respectivamente) que en el grupo G-120 (0.7 ± 0.1 mL y 3.0×10^9 , respectivamente; $P < 0.001$). La motilidad espermática fue menor en el grupo G-75 (2.6 ± 0.1), que en el grupo G-120 (3.2 ± 0.1 ; $P < 0.001$). La latencia a la eyaculación fue mayor en los machos del grupo G-75, que la registrada en el grupo G-120 ($P < 0.001$). Los resultados del presente estudio demuestran que, en los machos cabríos criollos tratados con 2.5 meses de días largos artificiales, la reducción de un 25% de sus requerimientos nutricionales afectó la calidad seminal y la latencia a la eyaculación durante el periodo de reposo sexual.

Palabras claves: Machos cabríos, Comportamiento sexual, Nutrición, Días largos artificiales, Calidad seminal.

ABSTRACT

The objective was to determine if the nutritional level reduces seminal quality and sexual behavior of the male goats treated with artificial long days. Sixteen male goats were divided into two treatments differing in their nutritional level. A group of males received 75 % of their maintenance and reproduction nutritional requirements (G-75; n=8), while another group received 120 % (G-120; n=8). The results shown that scrotal circumference was lower in the G-75 group, than that of group G-120 ($P < 0.01$). Similarly, the ejaculate volume and total number of sperm per ejaculate

were lower in the G-75 group (0.5 ± 0.05 mL and 1.9×10^9 , respectively) than in the G-120 group (0.7 ± 0.1 mL and 3.0×10^9 , respectively; $P < 0.001$). Sperm motility was lower ($P < 0.001$) in the G-75 group (2.6 ± 0.1) than in the G-120 group (3.2 ± 0.1). The ejaculation latency was higher in males of the G-75 group than that registered in the G-120 group ($P < 0.001$). The results of the present study demonstrate that, in creole male goats treated with 2.5 months of artificial long days, and a 25% reduction in their nutritional requirements, affected seminal quality and latency to ejaculation during the natural nonbreeding season.

Key words: Male goats, Sexual behavior, Nutrition, Artificial long-days, Seminal quality.

INTRODUCCIÓN

En el subtrópico mexicano, la actividad sexual y endocrina de los machos cabríos locales muestra variaciones estacionales a través del año. La actividad sexual inicia en mayo y termina en diciembre, con un periodo de reposo sexual de enero a abril. El periodo de actividad sexual en estos animales, se caracteriza principalmente, por un alto peso testicular, elevadas concentraciones de testosterona y una alta producción espermática (Delgadillo *et al.*, 1999). La estacionalidad reproductiva que presentan estos animales, es controlada por cambios en el fotoperiodo. El peso testicular y las concentraciones de testosterona, se incrementan durante los días cortos y se reducen durante los días largos (Delgadillo *et al.*, 2004a).

En el norte de México, el fotoperiodo es utilizado para inducir la actividad sexual de los machos durante el periodo de reposo sexual (Delgadillo *et al.*, 2004b). En los machos alimentados al 100% de sus necesidades nutricionales y expuestos a 2.5 meses de días largos (16 h luz: 8 oscuridad), a partir del 1 de noviembre, seguido de un implante de melatonina o de días naturales, se estimula su comportamiento sexual (latencia a la monta) y la secreción de testosterona de febrero a abril (Delgadillo *et al.*, 2001, 2002). Además, las características cuantitativas y cualitativas del semen de los ma-

*Autores para correspondencia: Manuel de Jesús Flores Nájera
Correo electrónico: mflores_najera@hotmail.com

Recibido: 21 de abril de 2020

Aceptado: 1 de septiembre de 2020

chos tratados son mejores que las obtenidas por los machos no tratados. Similarmente, en los machos alimentados bajo condiciones de pastoreo extensivo, la exposición a un tratamiento fotoperiódico de 2.5 meses de días largos seguido de días naturales, la intensidad del olor y el peso testicular se empieza a incrementar después de la quinta semana de terminar el tratamiento de luz (Cruz-Castrejon *et al.*, 2007). Estos estudios demuestran que la actividad sexual y endocrina de los machos cabríos puede ser estimulada eficazmente durante el período de reposo sexual usando días largos artificiales. Sin embargo, otros estímulos medioambientales tales como la disponibilidad de alimento y las interacciones sociales pueden modificar la calidad de la respuesta de los machos al tratamiento fotoperiódico. Por ejemplo, en algunas razas de cabras (Cashmere) y ovejas (Merino) que presentan una moderada estacionalidad reproductiva, la nutrición, es un fuerte modulador del inicio de la actividad sexual (Martin *et al.*, 2010). En estas razas, la respuesta reproductiva a la nutrición puede ser evaluada en dos niveles; uno llamado de corto plazo (< 10 días), en el cual la nutrición actúa principalmente a nivel sistema neuroendocrino que controla la secreción de gonadotropinas (Martin *et al.*, 1994) y otro llamado de largo plazo (> 3 semanas), en el cual la nutrición tiene un efecto sobre el peso, y la condición corporal, así como también en la circunferencia escrotal y la producción espermática (Walkden-Brown *et al.*, 1994a; Hotzel *et al.*, 2003; Flores *et al.*, 2010). En los carneros y machos cabríos, por ejemplo, está bien documentado que los cambios en la dieta por arriba o por debajo de los requerimientos nutricionales para mantenimiento y reproducción induce cambios importantes en el crecimiento testicular y la producción espermática (Martin *et al.*, 2010). En los carneros de la raza Merino, la producción espermática fue mayor en los machos suplementados con grano de lupino (26×10^6 espermias/g de testículo por día), que en los machos no suplementados (18×10^6 espermias/g de testículo por día; Oldham *et al.*, 1979). Similarmente, en los machos cabríos de la raza Cashmere en Australia, una dieta de baja calidad provocó una disminución del volumen testicular y una baja producción espermática, en comparación a los machos alimentados con una dieta de alta calidad (Walkden-Brown *et al.*, 1994a). Estos hallazgos sugieren que la influencia de la nutrición que actúa sobre la actividad reproductiva del macho puede ser determinante en el éxito del fotoperíodo artificial durante el periodo de reposo sexual.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la influencia del nivel nutricional sobre la calidad seminal y el comportamiento sexual de los machos cabríos tratados con días largos artificiales (16 h luz: 8 h oscuridad).

MATERIALES Y MÉTODOS

El procedimiento experimental reportado en la presente publicación cumple con la Norma Oficial Mexicana para las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) (SAGARPA, 2001).

Localidad

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Campo Experimental La Laguna, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, ubicado a $26^{\circ} 23' N$ y $104^{\circ} 47' O$ y a una altitud de 1,140 msnm, con clima semi-desértico, temperatura media de $20.3^{\circ} C$ y una precipitación media anual de 266 mm.

Diseño experimental

Los machos cabríos ($n=16$; 2 años de edad), utilizados en el presente estudio fueron obtenidos de un rebaño caprino del sistema de producción extensivo característico de la Comarca Lagunera (Coahuila, México). Estos animales derivan de las razas españolas, Granadina, Murciana y Malagueña que fueron importadas a México en el siglo XVI. En esta región, durante los últimos 60 años, esta población de animales ha sido cruzada con razas como la Alpina, Saanen y Anglo-Nubia para mejorar la producción de leche y carne (Delgadillo *et al.*, 2011).

Tratamiento fotoperiódico

El grupo de 16 animales fue dividido en dos grupos experimentales balanceados por peso, condición corporal y circunferencia escrotal (Tabla 1). Ambos grupos fueron sometidos a un tratamiento fotoperiódico para inducir su actividad sexual. El tratamiento consistió de 16 h luz y 8 h oscuridad aplicados del 1 de noviembre al 15 de enero de 2017. Para ello, el corral (10x4m) fue equipado con lámparas fluorescentes que emitían una intensidad luminosa de 300 lux a nivel de los ojos de los animales. Las luces fueron encendidas de 0600 a 0900 h y de 1700 a 2200 h para extender

Tabla 1. Peso vivo inicial y final (media \pm EEM), condición corporal y circunferencia escrotal de machos tratados con días largos artificiales que recibieron el 75% (G-75) o el 120% (G-120) de sus requerimientos nutricionales de mantenimiento y reproducción.

Table 1. Initial and final live weight (mean \pm SEM), body condition score and scrotal circumference of males treated with artificial long days who received 75% (G-75) or 120% (G-120) of their requirements nutritional of maintenance and reproduction.

Mediciones	Grupos experimentales	
	G-75	G-120
Peso vivo (kg)		
Inicial	42.5 \pm 2.5	41.7 \pm 1.8
Final	40.2 \pm 1.2	53.1 \pm 2.7
Condición corporal (puntos)		
Inicial	3.1 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1
Final	1.6 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1
Circunferencia escrotal (cm)		
Inicial	27.3 \pm 0.8	26.9 \pm 0.9
Final	26.5 \pm 0.1	30.0 \pm 0.8

G-75= Grupos de machos que recibió el 75% de sus requerimientos nutricionales.

G-120= Grupo de machos que recibió el 120% de sus requerimientos nutricionales.

la duración del día natural y obtener un total de 16 h luz por día. Al terminar el tratamiento de luz (16 de enero), los machos percibieron las variaciones naturales del fotoperiodo que, fluctuó en promedio 07:18 h al amanecer a 19:01 h al anochecer, resultando en una duración promedio del día de 11 h 42 min.

Nivel nutricional y manejo

Del 1 de noviembre de 2016 al 15 de enero del 2017 (tratamiento de días largos artificiales), los machos fueron alimentados a libre acceso con heno de alfalfa (18% PC, 1.95 Mcal de EM/kg de MS) y 300 g de concentrado comercial (14% PC, 1.7 Mcal de EM/kg de MS). A partir del 16 de enero y hasta el 15 de abril, un grupo de machos (G-75; n=8), recibió el 75% de sus requerimientos correspondientes al estado de mantenimiento y reproducción (NRC, 2007). En este grupo el consumo diario promedio fue de 1.1 kg MS con 2.1 Mcal de EM y 71 g de proteína. El otro grupo de machos (G-120; n=8), recibió el 120% de sus requerimientos nutricionales de mantenimiento y reproducción. El consumo en este grupo fue de 1.8 kg MS con 3.4 Mcal de EM y 112 g de PC. La dieta base utilizada en ambos tratamientos experimentales estuvo compuesta de heno de alfalfa (10%), heno de avena (30%), concentrado comercial (5%), rastrojo de maíz (50%) y melaza (5%). El consumo de materia seca fue ajustado semanalmente considerando el 3% del peso vivo de los animales. La alimentación fue proporcionada dos veces al día (09:00 h y 16:00 h). Para evitar la dominancia social entre los machos al momento de servir la alimentación, cada uno de los corrales (12 x 6 m, 1 corral/grupo) fue equipado con comederos individuales que permitían que cada uno de los machos consumiera su ración de acuerdo a su peso corporal. Todos los machos tuvieron acceso libre al agua y a las sales minerales que fueron proporcionadas en bloques de 25 kg (Cebú, Salinas del Rey, Torreón, Coahuila, México) conteniendo al menos 17% de P, 2% Mg, 1.5% Ca y 75% NaCl.

Mediciones

Peso corporal

El peso vivo fue medido cada quince días durante el tratamiento de días largos artificiales, y durante el tratamiento nutricional fue medido cada semana. Para ello, se utilizó una báscula móvil con una capacidad de 500 kg y una precisión de 100 g. Antes de llevar a cabo cada medición, todos los animales fueron sometidos a un periodo de 12 horas de ayuno.

Condición corporal

La condición corporal fue determinada cada quince días durante el tratamiento de días largos y al iniciar el tratamiento nutricional, la medición fue realizada cada semana mediante la técnica descrita por Walkden-Brown *et al.* (1997), la cual consistió en palpar la cantidad de tejido muscular y graso de la región lumbar del animal, usando la escala de 1 para animales muy delgados a 4 para animales obesos.

Circunferencia escrotal

La circunferencia escrotal fue determinada cada quince días durante el tratamiento de días largos y a partir de iniciar el tratamiento nutricional la medición fue realizada cada semana usando una cinta métrica flexible graduada en milímetros; la medición fue tomada de la parte más ancha de ambos testículos.

Intensidad del olor

La intensidad del olor fue determinada semanalmente mediante la técnica reportada por Walkden-Brown *et al.* (1994a), que consiste en oler la parte posterior de la región de la base de los cuernos a una distancia de 15 cm, la cual tiene una correlación positiva con la testosterona plasmática responsable de la actividad sexual de los machos. La técnica considera una escala de 0 a 3, donde el valor de 0 corresponde a olor neutro o igual a hembras o macho castrado, el valor de 1 corresponde a olor sexual ligero, 2 olor sexual moderado y el valor de 3 olor sexual intenso.

Medición de glucosa

Durante el tratamiento nutricional, las concentraciones de glucosa fueron determinadas cada semana. Una muestra de sangre (2 gotas) fue colectada a las 7 de la mañana por medio veno-punción yugular y puesta en una tira reactiva. La concentración de glucosa fue determinada usando un glucómetro (Accu Chek Sensor Comfort, Roche, México). El rango del glucómetro usado fue de 20 a 600 mg de glucosa/dL de sangre.

Calidad seminal

La calidad seminal fue evaluada durante cuatro días consecutivos por semana por un periodo de 13 semanas iniciando una semana antes de iniciar el tratamiento nutricional. En cada periodo de evaluación, el semen de los machos fue colectado a las 10:00 h usando una vagina artificial previamente preparada con agua a una temperatura de 40°C. Para la colección del semen, los machos fueron expuestos por un periodo de 5 minutos a una hembra intacta inducida al estro (Delgadillo *et al.*, 1991). La inducción de la hembra al estro fue realizada dos veces por semana mediante una inyección intramuscular de 2 mg de cipionato de estradiol. Inmediatamente después de la colección del semen, la motilidad espermática progresiva fue observada en un microscopio (x400; Cx LABOMED, Inc. USA). Para ello, una gota de semen no diluido fue colocado entre un portaobjetos y un cubreobjetos de vidrio precalentado (37°C). La escala empleada para esta medición fue de 0 a 5, donde 0 indica células sin movimiento y el valor de 5 corresponde a movimiento de células progresivo muy rápido (Delgadillo *et al.*, 1999). La concentración espermática (x10⁹) fue determinada con fotómetro Spermacue (Mexitube). El volumen del eyaculado (mL) se midió leyendo directamente de un tubo graduado, cuya capacidad fue de 15 mL y una graduación de 0.1 mL. El número total de espermatozoides por eyaculado (x10⁹) se obtuvo multiplicando el volumen del eyaculado por

la concentración espermática. Para este estudio, todos los machos fueron entrenados un mes antes de iniciar el estudio y la colección de semen fue realizado y evaluado siempre por la misma persona.

Comportamiento sexual

Además, en cada evaluación del semen, la actividad sexual fue determinada registrando la latencia a la eyaculación. Esta medición se consideró como el tiempo transcurrido entre la entrada del macho con la hembra y la eyaculación en la vagina artificial.

Análisis estadístico

El peso, la circunferencia escrotal y las concentraciones de glucosa fueron analizados mediante un análisis de varianza a dos vías (grupo y tiempo del experimento) con medidas repetidas. Dada la naturaleza ordinal de los datos de condición corporal, esta variable fue analizada para efecto de semana dentro de cada grupo usando la prueba de Friedman y, para la comparación entre los dos grupos en un tiempo determinado se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Los datos de la intensidad del olor fueron analizados con la prueba de U de Mann-Whitney. La latencia a la eyaculación, la motilidad espermática progresiva, la concentración espermática, volumen de eyaculado y número total de espermatozoides por eyaculado fueron sometidos a un análisis de varianza a dos vías (grupo y tiempo del experimento). Cuando existió una interacción entre grupo y tiempo, los datos fueron comparados dos a dos con una prueba de "t". Un análisis de correlación simple de Pearson fue desarrollado usando los datos de circunferencia escrotal, peso corporal, volumen de semen y número de espermatozoides por eyaculado. Los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico SYSTAT 12.

RESULTADOS

Peso corporal

Durante el tratamiento de días largos artificiales el peso corporal promedio no difirió entre grupos experimentales ($P > 0.05$). Sin embargo, durante el tratamiento nutricional, el peso fue más alto en el grupo G-120, que el registrado en el grupo G-75 ($P < 0.001$; Figura 1). Además, el efecto del nivel nutricional sobre el peso corporal difirió dependiendo del tiempo de estudio (interacción; $P < 0.0001$). Así, a partir de la tercera semana de iniciado el tratamiento nutricional y hasta finalizar el estudio, el peso corporal fue más alto en los machos del grupo G-120 (52.3 ± 1.8 kg), que el obtenido en el grupo G-75 (42.9 ± 2.1 kg; $P < 0.01$).

Condición corporal

La condición corporal promedio evaluada durante el tratamiento de días largos no difirió entre los tratamientos ($P > 0.05$). No obstante, durante el tratamiento nutricional, la condición corporal fue mayor en los machos del grupo G-120 que la obtenida en los machos del grupo G-75 ($P < 0.05$; Figura 1). En ambos grupos, la condición corporal varió a través de todo el estudio ($P < 0.0001$). De hecho, una interacción fue

encontrada entre el nivel nutricional y el tiempo de estudio ($P < 0.001$). A partir de la cuarta semana de iniciado el tratamiento nutricional, y hasta el finalizar el estudio, la condición corporal fue más alta en los machos del grupo G-120 (3.0 ± 0.06), que la registrada en los machos del grupo G-75 (1.8 ± 0.08 ; $P < 0.001$).

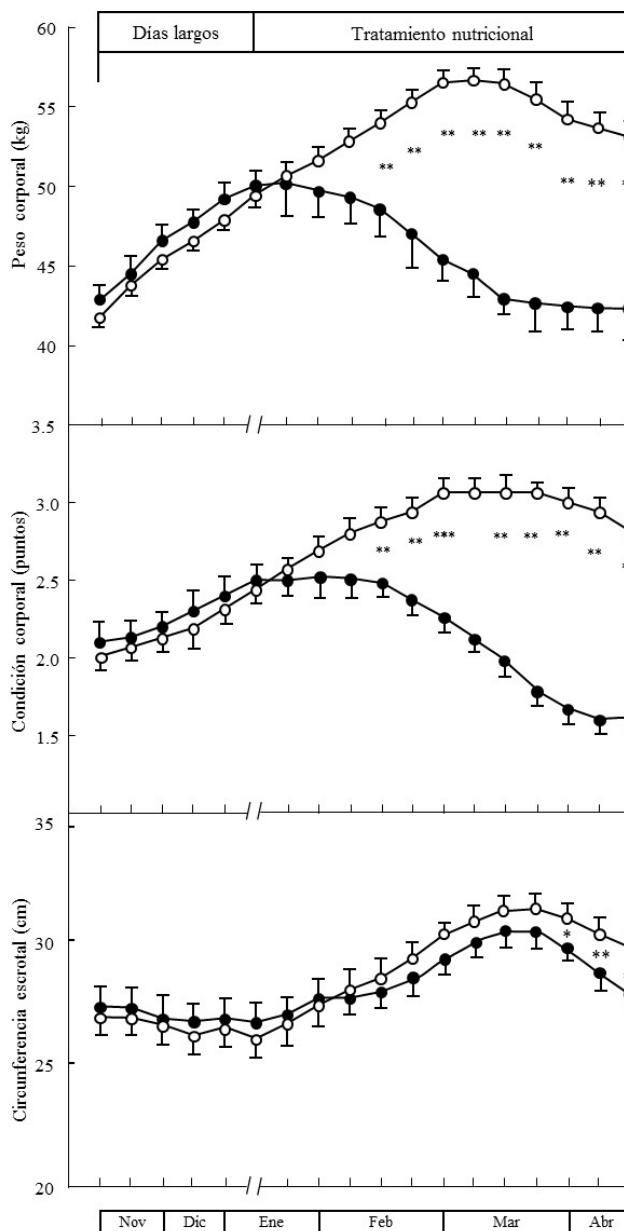


Figura 1. Circunferencia escrotal, peso y condición corporal promedio (\pm EEM) de machos cabríos tratados con días largos que recibieron el 75% (G-75, ●) o el 120% (G-120, ○) de sus requerimientos nutricionales. Diferencias significativas entre tratamientos son indicadas por un asterisco (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Figure 1. Mean scrotal circumference, weight and body condition score (\pm SEM) of male goats treated with artificial long days that received 75% (G-75, ●) or 120% (G-120, ○) of the their nutritional requirements. Significant differences between treatments are indicate by an asterisk (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$).

Circunferencia escrotal

Durante el tratamiento de días largos artificiales la circunferencia escrotal promedio no difirió entre grupos ($P > 0.05$). Igualmente, durante el tratamiento nutricional, la circunferencia escrotal no difirió entre tratamientos ($P > 0.05$). Sin embargo, hubo un efecto del tiempo de estudio ($P < 0.001$), así como una interacción entre el tratamiento y el tiempo sobre la circunferencia escrotal ($P < 0.01$; Figura 1). En efecto, durante las últimas tres semanas de estudio, la circunferencia escrotal fue más alta en los machos del grupo G-120 (30.4 ± 0.8 cm) que la registrada en el grupo G-75 (27.0 ± 0.9 cm; $P < 0.01$).

Intensidad del olor

No hubo un efecto del tratamiento nutricional sobre la intensidad del olor ($P > 0.05$; Tabla 2). Tampoco, hubo una interacción entre el tratamiento y el tiempo sobre esta variable ($P > 0.05$). En ambos grupos, la intensidad del olor fluctuó a través del estudio ($P < 0.001$), siendo el valor de 0 (olor neutro) al inicio del estudio a 2.4 al finalizar el estudio (olor sexual moderado a intenso; $P < 0.01$).

Concentraciones de glucosa

Las concentraciones de glucosa promedio fueron más altas en los machos del grupo G-120 que en los del grupo G-75 ($P < 0.001$; Tabla 2). En ambos tratamientos, hubo un efecto del tiempo sobre las concentraciones de glucosa ($P < 0.001$). Ninguna interacción fue observada entre el nivel nutricional y el tiempo de estudio ($P > 0.05$).

Producción espermática

Volumen de eyaculado

El volumen de eyaculado promedio fue mayor en los machos del grupo G-120, que en el grupo G-75 ($P < 0.001$; Tabla 2). Además, el efecto del nivel nutricional sobre el volumen de eyaculado difirió dependiendo del tiempo de estudio ($P < 0.001$). A partir de la segunda semana de marzo y hasta finalizar el estudio, el volumen de eyaculado fue más alto en los machos del grupo G-120 (1.0 ± 0.1 mL), que el obtenido en el grupo G-75 (0.5 ± 0.05 mL).

Concentración espermática

La concentración espermática promedio (espermatozoides/mL) fue mayor en el grupo G-120, que en el grupo G-75 ($P < 0.01$; Tabla 2). Además, la concentración espermática varió a través del tiempo ($P < 0.01$; Figura 2). Ninguna interacción fue encontrada entre el nivel nutricional y el tiempo de estudio sobre la concentración espermática ($P > 0.05$).

Motilidad espermática progresiva

La motilidad espermática progresiva promedio fue más alta en los machos del grupo G-120 (3.2 ± 0.1) que la obtenida en el grupo G-75 (2.6 ± 0.1 ; $P < 0.001$). En ambos grupos, la motilidad incrementó a través del tiempo ($P < 0.001$; Figura 2). Ninguna interacción fue encontrada entre el tratamiento nutricional y el tiempo sobre la motilidad espermática ($P > 0.05$).

Número total de espermatozoides por eyaculado

El número total de espermatozoides por eyaculado promedio fue mayor en el grupo G-120 (3.0×10^9) que en el grupo G-75 ($1.9 \pm 0.3 \times 10^9$; $P < 0.001$). Además, el número de espermatozoides se incrementó a través del tiempo ($P < 0.001$; Figura 2). Ninguna interacción fue encontrada entre el nivel nutricional y el tiempo el tiempo de estudio sobre el número total de espermatozoides por eyaculado ($P > 0.05$).

Comportamiento sexual

Latencia a la eyaculación

La latencia a la eyaculación fue más alta en los machos del grupo G-75 (109.9 ± 13.0 s), que la observada en el grupo G-120 (48.0 ± 4.3 s; $P < 0.001$). Además, en ambos grupos experimentales la latencia varió a través del tiempo ($P < 0.001$; Figura 2). Ninguna interacción fue encontrada entre el tratamiento nutricional y el tiempo sobre la latencia a la eyaculación ($P > 0.05$). En el grupo G-75, la latencia a la eyaculación fue negativamente correlacionada con el peso corporal ($r = -0.63$; $P < 0.02$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que, la restricción nutricional de un 25% de sus necesidades

Tabla 2. Concentraciones de glucosa (media \pm EEM), intensidad del olor, volumen de eyaculado y concentración espermática de machos cabríos tratados con días largos que recibieron el 75% (G-75) o el 120% (G-120) de sus requerimientos nutricionales.

Table 2. Glucose concentrations (mean \pm SEM), odor intensity, ejaculate volume and sperm concentration of male goats treated with long days that received 75% (G-75) or 120% (G-120) of their nutritional requirements.

Mediciones	Grupos experimentales		Probabilidad		
	G-75	G-120	G	G x T	T
Glucosa (mg/dL)	38.9 \pm 0.6	41.2 \pm 0.6	0.001	0.160	0.001
Intensidad del olor (puntos)	2.3 \pm 0.5	2.6 \pm 0.3	0.860	0.535	0.01
Volumen de eyaculado (mL)	0.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.001	0.001	0.001
Concentración espermática ($\times 10^9$)	3.9 \pm 0.3	4.3 \pm 0.9	0.01	0.484	0.01

G= Efecto grupo; GXT= Interacción grupo x tiempo; T= Efecto tiempo

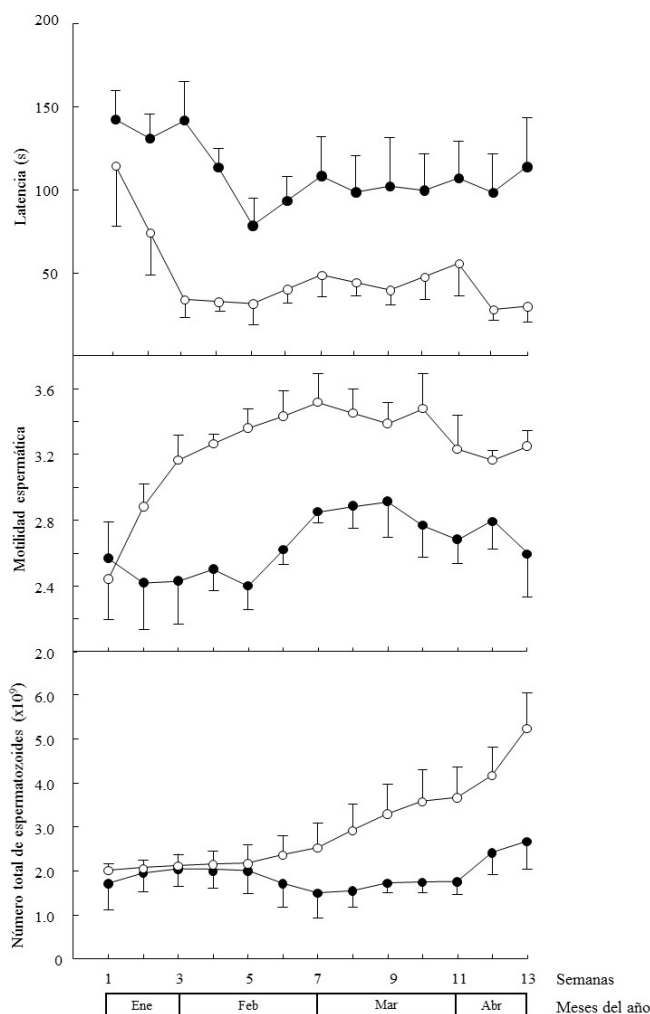


Figura 2. Calidad seminal de machos cabríos tratados con días largos que recibieron el 75% (G-75, ●) o el 120% (G-120, ○) de sus requerimientos nutricionales (media \pm EEM).

Figure 2. Seminal quality of male goats treated with artificial long days that received 75% (G-75, ●) or 120% (G-120, ○) of their nutritional requirements (mean \pm SEM).

nutricionales redujo la calidad seminal y el comportamiento sexual de los machos cabríos criollos tratados con 2.5 meses de días largos artificiales. En efecto, durante el periodo de actividad sexual, los valores de volumen de semen, motilidad espermática progresiva, concentración espermática y el número de espermatozoides por eyaculado fueron menores en los machos del grupo G-75 que los registrados en los machos del grupo G-120, los cuales fueron alimentados con una dieta que cubrió el 120% de sus requerimientos nutricionales. La latencia a la eyaculación (un índice del comportamiento sexual de los machos), fue más alta en los machos del grupo G-75, que la obtenida en los machos del grupo G-120.

La calidad espermática y el comportamiento sexual observado en los machos del grupo G-120 confirman lo previamente reportado por Delgadillo *et al.* (2001). En ese estudio, el cual se desarrolló con machos alimentados al 100% de sus requerimientos nutricionales, las características cuantitativas y cualitativas del semen se incrementaron de

febrero a abril, alcanzando su máximo nivel 10 semanas después de terminar el tratamiento de días largos. En el presente estudio, la motilidad espermática, el volumen de eyaculado y el número de espermatozoides por eyaculado, se empezaron a incrementar a partir del mes de febrero, alcanzando su máximo nivel entre marzo y abril. Estos resultados y los reportados por Delgadillo *et al.* (2001) confirman claramente que, en los machos cabríos alimentados al 120% de sus necesidades nutricionales, la aplicación de 2.5 meses de días largos artificiales seguido de días naturales pueden ser utilizados eficazmente para inducir la actividad sexual e incrementar la calidad espermática durante el periodo de reposo sexual. Sin embargo, en comparación a los machos del grupo G-120, en el grupo G-75, el tratamiento nutricional causó una ligera reducción de la circunferencia escrotal al final del estudio, así como también una reducción de la calidad espermática, y un incremento de la latencia a la eyaculación, principalmente en los meses de marzo y abril. Estos resultados demuestran que a pesar de que los días largos artificiales son efectivos para inducir la actividad sexual de los machos durante el periodo de reposo sexual, la reducción de un 25% de los requerimientos nutricionales al finalizar el tratamiento de luz afectó considerablemente las características cualitativas y cuantitativas del semen. Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores, quienes indican que la reducción de la circunferencia escrotal y, por lo tanto, la producción espermática depende básicamente del estado nutricional de los animales (Walkden-Brown *et al.*, 1994a). En los machos cabríos Cashmere Australianos, por ejemplo, una dieta de baja calidad, redujo la circunferencia escrotal, la intensidad del olor y las concentraciones de testosterona durante los primeros tres meses del estudio. Asimismo, en los carneros de la raza Sardinian en Italia, una dieta de baja calidad proporcionada durante un periodo de 90 días redujo el volumen del eyaculado, la motilidad masal y la concentración espermática (Tufarelli *et al.*, 2011).

El mecanismo mediante el cual la nutrición reduce la calidad espermática en los machos cabríos aún no está totalmente entendido. Sin embargo, una posibilidad puede estar asociada al tamaño de la circunferencia escrotal de los machos, el cual es un fuerte predicador de la producción espermática (Walkden-Brown *et al.*, 1994b). En el presente estudio, a pesar de que en ambos grupos se observó un incremento en la circunferencia escrotal durante el tratamiento nutricional. La circunferencia escrotal fue ligeramente mayor en el grupo G-120, lo cual pudo haber mejorado las características cuantitativas del semen, en comparación a los machos del grupo G-75. Estudios similares han sido reportados en carneros y machos cabríos; en estas especies, el consumo de una dieta de alta calidad incrementó el tamaño testicular y la producción espermática, en comparación a los machos que recibieron una dieta de baja calidad (Walkden-Brown *et al.*, 1994a; Oldham *et al.*, 1978; Murray *et al.*, 1990).

Otra posibilidad puede estar asociada a la eficiencia con la cual los gametos son producidos por el tejido testicular. Por ejemplo, en un estudio desarrollado en carneros,

se encontró que la pérdida de un 25% del peso testicular, condujo a una reducción del 46% en la producción espermática por gramo de testículo por día (Oldham *et al.*, 1978). En nuestro estudio, la disminución de 2.2 cm en la circunferencia escrotal observada en los machos del grupo G-75, puede estar asociado a una reducción del 54% en el número total de espermatozoides por eyaculado.

Además, el efecto de la nutrición sobre la circunferencia escrotal y el número de espermatozoides por eyaculado encontrados en el presente estudio, pueden estar asociados a cambios morfométricos a nivel testicular. En carneros, se demostró que la longitud y diámetro de los túbulos seminíferos fue mayor en los testículos de machos alimentados con una dieta de alta calidad que la de los machos alimentados con una dieta de baja calidad (Hotzel *et al.*, 1998). De hecho, Pisselet *et al.* (1984) encontraron una correlación positiva entre el diámetro testicular y la longitud de los túbulos seminíferos.

Recientes estudios desarrollados en carneros, se encontró que la desnutrición no sólo afecta la producción espermática, sino también perjudica considerablemente la calidad de los espermatozoides (Guan y Martin, 2017). En nuestro estudio, la reducción de un 25% de los requerimientos nutricionales de los machos no solo afectó el número de espermatozoides por eyaculado, sino que podría haber ocasionado un daño del ADN de las células espermáticas y una disminución en la velocidad espermática (Guan *et al.*, 2014). De hecho, en carneros se reportó que el daño ocasionado en el ADN espermático, fue correlacionado inversamente con el cambio en la circunferencia escrotal, con la motilidad espermática progresiva y con el número de espermatozoides por gramo de testículo (Guan *et al.*, 2014). Esta reducción en la calidad del espermatozoide inducida por la desnutrición, es causada al menos en parte, por un aumento de la apoptosis de las células germinales (Guan *et al.*, 2015) y a una alteración en la función de las células de Sertoli (Guan *et al.*, 2016).

Por otro lado, es probable que la respuesta corto plazo del sistema neuroendocrino que controla la actividad testicular de los machos haya sido afectado por el nivel nutricional. En efecto, se ha demostrado que incrementar el nivel nutricional por arriba de los requerimientos de mantenimiento conduce a un rápido aumento en la frecuencia de pulsos de LH (Martín y Walkden-Brown, 1995). En carneros, por ejemplo, la frecuencia de pulsos de LH determinada en un periodo de 6-8 h, se incrementó de 2 a 3 veces más en los animales alimentados con una dieta al doble de su mantenimiento, que los alimentados solo con una dieta de mantenimiento (Martin *et al.*, 1994b). Sin embargo, la alta frecuencia pulsátil de LH fue mantenida sólo por cuatro semanas, posteriormente, los valores volvieron a descender a pesar de mantener el alto consumo de energía. La vía mediante la cual las señales nutricionales periféricas modulan la actividad de las células de GnRH-LH a corto plazo aún no está totalmente determinado. No obstante, parece que en la señalización del intestino al cerebro pueden estar involucradas algunas hormonas metabólicas, especialmente leptina e insulina, así

como las concentraciones de ácidos grasos y glucosa (Blache *et al.*, 2000).

En el presente estudio, el nivel nutricional también modificó el comportamiento sexual de los machos. En el grupo G-75, los machos tardaron más tiempo en eyacular (latencia a la eyaculación) que los machos del grupo G-120. En este último grupo, la latencia a la eyaculación fue similar a la previamente reportada por otros autores, en machos cabríos tratados con días largos artificiales y melatonina (Delgadillo *et al.*, 2001). En ese estudio, el cual se realizó con machos alimentados al 100% de sus necesidades nutricionales, la latencia a la eyaculación fue similar a la obtenida en el grupo G-120 (48 s). La reducción de la latencia a la eyaculación registrada en este grupo de machos, se debió probablemente a un incremento de la secreción de testosterona inducida por el tratamiento fotoperiódico (Hotzel *et al.*, 2003). En cambio, la latencia a la eyaculación determinada en los machos del grupo G-75, concuerda con los datos reportados en machos cabríos de la raza Payoya (Zarazaga *et al.*, 2009). En esta raza, la latencia a la eyaculación fue positivamente influenciada por el nivel nutricional. Así, los machos que recibieron 1.1 veces sus necesidades de mantenimiento, incrementó la latencia a la eyaculación a 61.6 s. En cambio, en los machos alimentados 1.6 veces sus necesidades de mantenimiento, la latencia se redujo a 43.2 s. Aunque el preciso mecanismo mediante el cual la nutrición afecta el comportamiento sexual de los machos aún no está totalmente comprendido. Se ha sugerido que el incremento de la latencia a la eyaculación observada en los machos del grupo G-75 (109 s), se deba a una pérdida de peso, más que un efecto del nivel nutricional sobre los centros neurales que controlan la libido del macho (Parker *et al.*, 1972). En el presente estudio, los machos del grupo G-75 perdieron más peso (20%) que los del grupo G-120. Otra posibilidad puede ser estar asociado a una reducción de los niveles de energía de los animales, puesto que en el grupo G-75, los niveles de glucosa fueron menores a los observados en el grupo G-120, y esta condición pudo haber afectado el rendimiento sexual de los machos.

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que, a pesar de que los días largos artificiales son efectivos para inducir la actividad sexual de los machos durante el periodo de reposo sexual, una reducción de un 25% de sus necesidades nutricionales proporcionada al finalizar el tratamiento de luz, afectó el comportamiento sexual de los machos, y redujo considerablemente las características cualitativas y cuantitativas del semen. Sin embargo, la alimentación de los machos por arriba de sus necesidades nutricionales (120%), mejoró notablemente el comportamiento sexual y las características del semen.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al INIFAP Campo Experimental La Laguna por el apoyo financiero otorgado a la Unidad de Reproducción Caprina (proyecto: 950512897).

REFERENCIAS

- Cruz-Castrejón, U., Veliz, F.G., Rivas, R., Flores, J.A., Hernández, H., Duarte, G. 2007. Respuesta de la actividad sexual a la suplementación alimenticia de machos cabríos tratados con días largos, con un manejo extensivo a libre pastoreo. *Técnica Pecuaria México*. 45:93-100.
- Blache, D., Chagas, L.M., Blackberry, M.A., Vercoe, P.E., Martin, G.B. 2000. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. Review. *Journal of Reproduction and Fertility*. 230: 1-11.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P. 1991. Decrease in the seasonality of sexually behaviour and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology*. 36:755-770.
- Delgadillo, J.A., Canedo, G.A., Chemineau, P., Guillaume, D., Malpoux, B. 1999. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats subtropical northern Mexico. *Theriogenology*. 52:727-737.
- Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Moran, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B. 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *Journal of Animal Science*. 79: 2245-2252.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Veliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B. 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *Journal of Animal Science*. 80: 2780-2786.
- Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B. 2004a. Evidence that photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reproduction Nutrition and Development*. 44: 183-193.
- Delgadillo, J.A., Fitz, G., Duarte, G., Veliz, G., Carrillo, E., Flores, J.A., Vielma, J., Hernández, H., Malpoux, B. 2004b. Management of photoperiod to control caprine reproduction in the subtropics. *Reproduction Fertility and Development*. 16: 471-478.
- Delgadillo, J.A. 2011. Environmental and social cues can be used in combination to developed sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropics. *Animal*. 5:74-81.
- Guan, Y., Malecki, I.A., Hawken, P.A.R., Linden, M.D., Martin, G.B. 2014. Under-nutrition reduces spermatogenic efficiency and sperm velocity, and increases sperm DNA damage in sexually mature male sheep. *Animal Reproduction Science*. 149: 163-172.
- Guan, Y., Lian, G., Hawken, P.A.R., Malecki, I.A., Cozens, G., Vercoe, P.E., Martin, G.B and Guan, L. 2015. Roles of small RNAs in the effects of nutrition on apoptosis and spermatogenesis in the adult testis. *Scientific Reports*. 5: 10372.
- Guan, Y., Liang, G., Hawken, P. A. R., Meachem, S.J., Malecki, I.A., Ham, S., Stewart, T., Guan, L., Martin, G.B. 2016. Nutrition affects Sertoli cell function but not Sertoli cell numbers in sexually mature male sheep. *Reproduction, Fertility and Development*. 28: 1152-1163.
- Guan, Y and Martin, G.B. 2017. Cellular and molecular responses of adult testis to changes in nutrition: novel insights from the sheep model. *Reproduction*. 154: R133-R141.
- Flores, M.J., Meza-Herrera, C.A., Echavarría, F.G., Villagomez, E., Iñiguez, L., Salinas, H., González-Bulnes, A. 2010. Influence of nutritional and socio-sexual cues upon reproductive efficiency of goats exposed to the male effect under extensive conditions. *Animal Production Science*. 50: 897-901.
- Hotzel, M.J., Markey, C.M., Walkden-Brown, S.W., Blackberry, M.A., Martin, G.B. 1998. Morphometric and endocrine analyses of the effects of nutrition on the testis of mature Merino rams. *Journal of Reproduction and Fertility*. 113:2017-2030.
- Hotzel, M.J., Walkden-Brown, S.W., Fisher J.M., Martin, G.B. 2003. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. *Reproduction Fertility and Development*. 15:1-9.
- Martin, G.B., Tjondronegoro, S., Boukhliq, R., Blackberry, M.A. 1994. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 110:121-128.
- Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W., Boukhliq, R., Tjondronegoro, S., Miller, D.W., Fisher, J.S., Hotzel, M.J. 1994b. Non-photoperiodic inputs seasonal breeding in male ruminants. In: *Perspectives in Comparative Endocrinology* (eds Davey, K.G., Peter, R.E and Tobe, S.S) pp. 574-585.
- Martin, G.B., Walkden-Brown, S.W. 1995. Nutritional influence on reproduction in mature sheep and goats. *Journal of Reproduction and Fertility*. Supplement 49: 437-449.
- Martin, G.B., Blache, D., Miller, D.W., Vercoe, P.E. 2010. Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal*. 7: 1214-1226.
- Murray, P.J., Rowe, J.B., Pethick, D.W., Adams, N.R. 1990. The effect of nutrition on testicular growth in the Merino ram. *Australian Journal of Agricultural Research*. 41:185-95.
- NRC. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids. Washington, DC, USA National Academy Press; 2007.
- Oldham, C.M., Adams, N.R., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., Mackintosh, J.B. 1978. The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. *Australian Journal of Agricultural Research*. 29:173-179.
- Parker, G.V., Thwaites, C.J. 1972. The effects of undernutrition on libido and semen quality in adult Merino rams. *Australian Journal of Agricultural Research*. 23:109-115.
- Pisselet, C., Perreau, C., Hochereau-de Reviers, M.T. 1984. Relationship between rete testis fluid secretion and testicular structure in the ram. *Reproduction Nutrition and Development*. 24: 483-486.
- Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, 22 August 2001.
- SYSTAT 12, 2012 Chicago, IL, USA.
- Tufarelli, V., Lacalandra, G.M., Aiudi, G., Binetti, F., Laudadio, V. 2011. Influence of feeding level on live body weight and semen characteristics for Sardinian rams reared under intensive conditions. *Tropical Animal Health and Production*. 43:339-345.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B. 1994a. Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian cashmere goats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102:351-360.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Taylor, W.A. 1994b. Testicular and epididymal sperm content in grazing Cashmere bucks: seasonal variation and prediction from measurements *in vivo*. *Reproduction Fertility and Development*. 6:726-736.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Scaramuzzi, R.J., Martin, G.B., Blackberry, M.A. 1997. Seasonality in male Australian cashmere goats: Long term effects of castration and

testosterone or oestradiol treatment on changes in LH, FSH and prolactin concentrations, and body growth. *Small Ruminant Research*. 26:239-252.

Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R. 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya bucks goats. *Theriogenology*. 71:1316-1325.

Rentabilidad y rendimiento de girasol en función del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante

Sunflower profitability and grain yield as function of soil type, nitrogen and biofertilizer

Y.R. Arenas-Julio¹, J.A.S. Escalante-Estrada¹, C. Aguilar-Carpio^{3*}, M.T. Rodríguez-González¹ y E. Sosa-Montes^{2*}

¹ Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, CP. 56230. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México.

² Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera Federal México-Texcoco Km 38.5, CP. 56230.

³ IDAGRO S. de R. L. de C. V. Carretera Yautepec-Tlayacapan S/N. Col. Puente Pantitlán. Tlayacapan, Mor. C. P. 62545.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante sobre la fenología, biomasa total, rendimiento de grano y sus componentes en el cultivo de girasol. El estudio se realizó en el Colegio de Postgraduados, donde se sembró el girasol cv. Victoria. Los tratamientos en estudio fueron dos tipos de suelo en los cuales se aplicó dos niveles de nitrógeno, con y sin biofertilizantes. Se evaluó la fenología de la planta, biomasa total, índice de cosecha, rendimiento y sus componentes. Para los suelos en estudio se encontró que la fertilización nitrogenada y el biofertilizante no modificaron el tiempo a ocurrencia de las etapas fenológicas, pero sí se observó un cambio en la biomasa total y rendimiento de grano, donde la mayor producción se registró con la aplicación de nitrógeno a 100 kg ha⁻¹ y la inoculación del biofertilizante, lo que a su vez generó el mayor ingreso neto, en el suelo con la salinidad más baja.

Palabras clave: *Helianthus annuus*, biomasa total, fertilización, salinidad.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the influence of soil type, nitrogen and biofertilizer on phenology, total biomass, grain yield and its components on sunflower cultivation. At the Postgraduates College, the study was carried out, where the sunflower cv Victory was sowed. The treatments under study were two types of soil with two nitrogen levels, with and without biofertilizers. The plant's phenology, total biomass, harvest index, grain yield and its components were evaluated. For the soils under study, nitrogen fertilization and the biofertilizer were found not to affect the phenological stages, but a change in total biomass and grain yield was observed, where the highest production and net income was recorded with the application of nitrogen at 100 kg ha⁻¹ and biofertilizer inoculation, in the soil with the lowest salinity.

Key words: *Helianthus annuus*, total biomass, fertilization, salinity.

INTRODUCCIÓN

El girasol (*Helianthus annuus* L.), es uno de los cultivos oleaginosos más importantes para la producción de aceite,

además es considerado como uno de los aceites con mayores beneficios para la salud, por su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Werteker *et al.*, 2010). En México en los últimos años ha tomado importancia debido a que es una oleaginosa con gran potencial aceitera. Para el 2018 la producción nacional de girasol fue de 9,263 t en una superficie cosechada de 6,629 ha, con un rendimiento promedio de 1.39 t ha⁻¹, donde los principales estados productores fueron Sonora, Zacatecas, Guanajuato, Jalisco y Estado de México (SIAP, 2018).

Con el uso de prácticas agrícolas adecuadas se provee a los cultivos una mayor expresión del rendimiento, dentro de dichas prácticas destacan la preparación del suelo, densidad de población y fertilización. El rendimiento de girasol es controlado por factores, como la selección de híbridos, una adecuada tecnología, el manejo de prácticas agrícolas especialmente en la densidad óptima de población y el uso de fertilizantes (nitrógeno) (Ishfaq, 2009). Investigaciones anteriores que se han desarrollado con girasol, han demostrado que con aplicaciones de fertilizante nitrogenado se han incrementado el rendimiento de semilla por unidad de superficie, la producción de materia seca, número de semillas m⁻² y área del capítulo (Ahmed y El-Araby, 2012; Ali *et al.*, 2012; Nasim *et al.*, 2012). Un indicador importante respecto al uso del nitrógeno es su eficiencia agronómica, que indica el incremento en el rendimiento económico de un cultivo por unidad de nitrógeno aplicado (Ali *et al.*, 2012).

Las características del suelo como su textura, mineralogía, estructura, materia orgánica son en gran medida responsables de como el suelo afecta el rendimiento en cultivos. Un problema que limita el crecimiento y desarrollo de las plantas es la salinidad del suelo, el origen de estos tipos de suelos puede ser muy diverso pudiendo ser de manera general o antrópico. La salinidad del suelo es un problema que se incrementa año con año en las regiones áridas y semiáridas del mundo como consecuencia de una baja precipitación y un mal manejo del agua de riego y los fertilizantes. La salinidad y la sequía son dos de los factores limitativos ambientales que afectan el establecimiento y desarrollo de las especies, así como la producción agrícola (Martínez *et al.*, 2011).

Por otro lado, los fertilizantes microbiológicos son considerados una parte importante de las prácticas agrí-

*Autor para correspondencia: Cid Aguilar Carpio

Correo electrónico: aguilar.cid@colpos.mx

Recibido: 07 de mayo de 2020

Aceptado: 12 de agosto de 2020

colas sostenibles, con entradas de bajo costo; fijación de nitrógeno, solubilización de fosfato, potasa y de movilización de microorganismos en la planta (Mishra y Dadhich, 2010). Los biofertilizantes contienen microorganismos específicos en formas concentradas, derivados de la zona radicular del suelo, en donde establecen una simbiosis mutualista con las raíces de la mayoría de las plantas; los cuales ayudan a mejorar el crecimiento gracias al sistema de hifas que se desarrollan fuera de la raíz y que permiten una mayor exploración del suelo al incrementar la captación de nutrimentos poco móviles, resistencia y/o tolerancia de la planta a la sequía y salinidad (Tapia *et al.*, 2010). Para lograr una producción sostenible de girasol es necesario complementar la fertilización química con formas biológicas, para obtener en lo posible un impacto en la producción y en la conservación del ambiente. Las bacterias y hongos son capaces de proveer a la planta diferentes nutrientes en forma asimilable. Esto puede ocurrir mediante diferentes procesos, por ejemplo, la inoculación de las plantas con micorrizas, que contribuye a incrementar la absorción de agua, solubilizar los minerales y transformar el fósforo que se encuentra en el suelo, formando compuestos estables, en formas disponibles para la planta (Madhurendra *et al.*, 2009; Zarabi *et al.*, 2011; Ahmed y El-Araby, 2012). Múltiples estudios han revelado que los biofertilizantes influyen en el crecimiento y producción de los cultivos. Al respecto, Sotelo *et al.* (2016) y Mena *et al.* (2018) observaron una mayor producción en la biomasa, rendimiento y diámetro del capítulo con el uso de biofertilizantes en el cultivo de girasol. Por lo cual el objetivo del presente estudio fue determinar la influencia del tipo de suelo, nitrógeno y biofertilizante sobre la fenología, biomasa total, rendimiento de grano y sus componentes (peso de 100 granos y área del capítulo) en el cultivo de girasol.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se estableció en dos sitios del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México (19° 29' norte; 98° 54' oeste y 2,250 msnm), bajo condiciones de temporal. El clima es de tipo BS1 que corresponde al menos seco de los áridos con lluvias en verano, una temperatura media anual de 14.6 °C y precipitación media anual de 500 mm (García, 2004). En el mes de mayo de 2012, se sembró el girasol cv. Victoria (aceitero) en una densidad de 80,000 plantas ha⁻¹. Los tratamientos fueron: dos tipos de suelo, los cuales presentaron las siguientes características: suelo 1 (S1), textura franco arenoso, pH de 7.1 y CE de 0.49 dS m⁻¹, suelo 2 (S2), textura franco arcilloso limoso, pH de 7.8, CE de 1.75 dS m⁻¹; dos niveles de nitrógeno de 0 (N0) y 100 kg ha⁻¹ (N100), los cuales se aplicaron de forma fraccionada, la mitad al momento de la siembra y el resto a los 30 días, como fuente de nitrógeno se utilizó urea (46 % de N); con y sin biofertilizantes, el cual consistió en la inoculación a la semilla de bacterias fijadoras de nitrógeno *Azospirillum brasilense* (0.4 kg) y hongos micorrízico *Glomus intraradices* (1 kg), las cuales fueron mezcladas con agua y adherente. El diseño experimental fue bloques completos al azar con arreglo de parcelas subdivididas y cuatro repeticio-

nes. Durante el desarrollo del estudio se registró la temperatura máxima, mínima, evaporación y precipitación, los datos fueron proporcionados por la estación agrometeorológica del Colegio de Postgraduados. La evapotranspiración del cultivo (ETc, mm d⁻¹) se calculó mediante la ecuación:

$$ETc = Ev \times Ke \times Kc, \text{ (Doorenbos y Pruitt, 1986)}$$

Donde: Ev = evaporación del tanque A; Ke = coeficiente para el evaporímetro (0.6); y Kc = coeficiente del cultivo (0.8 para girasol). Así mismo se calculó las unidades calor (UC, °C d), mediante el método residual de Flores *et al.* (1985), el cual es descrito por la siguiente ecuación:

$$UC = \frac{(T_{\text{máx}} + T_{\text{mín}}) - TB}{2}$$

Dónde: T_{máx} = Temperatura máxima diaria (°C), T_{mín} = Temperatura mínima diaria (°C) y TB = Temperatura base, considerada como 8 °C (Sadras y Hali, 1988). Las etapas fenológicas registradas fueron: días a emergencia (E), floración (R5) y madurez fisiológica (R9) (Schneiter y Miller, 1981). A la cosecha se registró la biomasa total (BT) (peso de receptáculo, tallo y hojas + peso del grano), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG) y sus componentes, como área del capítulo (AC) y peso de 100 semillas (P100S). A las variables en estudio se les aplicó un análisis de varianza y se aplicó la prueba de comparación de medias Tukey (P ≤ 0.05) con el paquete estadístico SAS versión 9.1 (SAS, 2004).

Para el análisis económico se estimaron los costos arrojados por cada tratamiento utilizando las siguientes ecuaciones (Bueno *et al.*, 2005):

Costo total (CT), es la suma de los costos fijos (CF) y variables (CV).

$$CT = (CF + CV)$$

Ingreso total (IT), se calculó con la siguiente fórmula:

$$IT = Py Y$$

Donde: Py = precio del producto (\$20.00 para ese año); Y = producción ha⁻¹.

Ingreso neto (IN), es la diferencia del costo total (CT) y el ingreso total (IT).

$$IN = (IT - CT)$$

Ganancia por peso invertido (GPI), se obtuvo dividiendo el ingreso neto (IN) entre el costo total (CT).

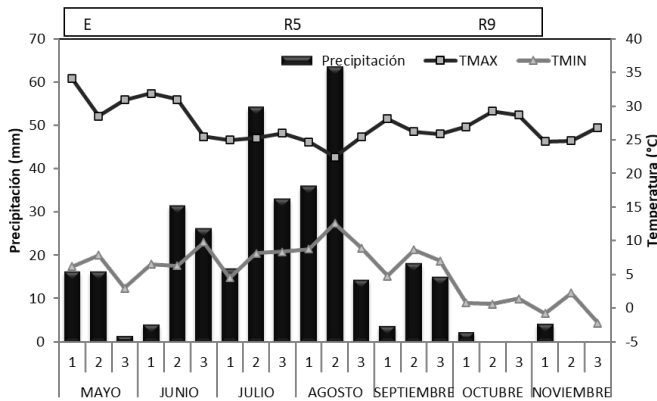
$$GPI = (IN/CT)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Elementos del clima y fenología

En la Figura 1, se presentan los datos de temperatura máxima (T_{max}), mínima (T_{min}) promedio decenal y la precipitación suma decenal, durante el ciclo del cultivo se observó que el promedio decenal durante la estación de crecimiento de T_{max} fluctuó entre 34 y 22 °C y la T_{min} de 12 a -2 °C. Las condiciones climáticas de temperaturas fueron apropiadas para el desarrollo del cultivo del girasol (Escalante *et al.*, 2015). La temperatura más alta ocurrió en la etapa vegetativa del cultivo en los meses de mayo y junio, posteriormente,

Figura 1. Temperatura máxima, mínima (media decenal) y precipitación (suma decenal) durante el ciclo de cultivo de girasol. E = Emergencia, R5 = Floración y R9 = Madurez fisiológica.
Figure 1. Maximum, minimum temperature (average decenal) and precipitation (sum decenal) during the sunflower growing cycle. E = Emergency, R5 = Flowering and R9 = Physiological maturity.



disminuyó conforme el ciclo de cultivo avanzó, debido principalmente al incremento en la precipitación (386 mm), donde la más alta se observó en el mes de agosto a inicios de la floración, sin embargo, se redujo en etapa de llenado de grano, lo cual indica que al final del ciclo el cultivo presentó un déficit hídrico, que pudo afectar el rendimiento (Escalante y Rodríguez, 2010).

La ocurrencia de las etapas fenológicas fue similar para todos los tratamientos. Esto, se pudo deber a que la nutrición en el suelo fue suficiente para que el cultivo no modificara la ocurrencia de las etapas fenológicas durante el desarrollo del estudio. Así, para ambos suelos la E se presentó a los 8 dds, el periodo de R5 ocurrió a los 68 dds y la madurez fisiológica se presentó a los 120 días (Figura 1). Estos resultados concuerdan parcialmente con los reportados por Escalante y Rodríguez (2010) al evaluar la fenología de girasol en tres niveles de salinidad del suelo y en agrosistemas (girasol-frijol), en donde la E se presentó a los 8 dds, el periodo de R5 ocurrió a los 80 dds y R9 a los 130 dds.

Unidades Calor y evapotranspiración

La acumulación de unidades calor (UC) en relación con la ocurrencia de las etapas fenológicas del cultivo se presentan en la Figura 2. El requerimiento térmico del girasol fue similar entre tratamientos. De esta manera, la acumulación de UC fue de 125 °C, 705 °C y 1,551 °C durante las etapas E, R5 y MF, respectivamente, datos similares fueron reportados por Morales *et al.* (2006) al evaluar girasol en cultivo asociado con frijol (*Phaseolus vulgaris*. L). El modelo para estimar las UC para el genotipo y condiciones del presente estudio fue $UC = 22.9 \text{ dds}$, $R^2 = 0.99^{**}$. La ETc del girasol también fue similar entre tratamientos. En la Figura 2 se muestra que la ETc acumulada para las etapas E, R5 y MF fue de 18 mm, 139 mm y 377 mm, respectivamente.

En la Figura 2, que relaciona la evapotranspiración acumulada del cultivo (ETc), se observa que el periodo de siembra a emergencia, la ETc fue de 18 mm, en el periodo

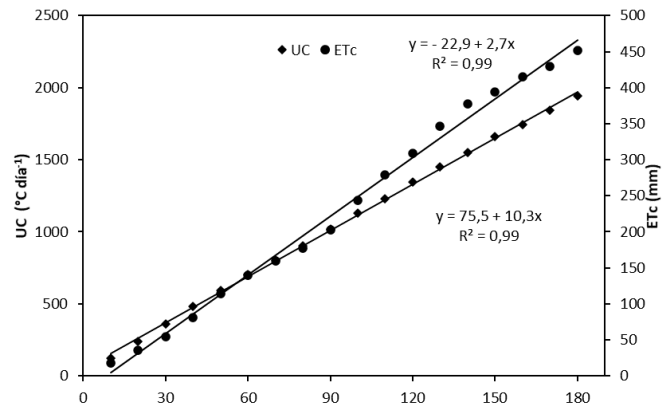


Figura 2. Unidades calor (UC) y Evapotranspiración (ETc) acumuladas de girasol cv. Victoria. E = Emergencia, R5 = Floración, R9 = Madurez fisiológica.
Figure 2. Accumulated heat units (UC) and Evapotranspiration (ETc) from sunflower cv. Victoria. E = Emergency, R5 = Flowering, R9 = Physiological maturity.

de emergencia a antesis la ETc fue de 121 mm y de antesis a madurez fisiológica fue de 256 mm. La ETc acumulada durante todo el ciclo del cultivo fue de 377 mm. Así mismo Morales *et al.* (2006), al evaluar el girasol cv. Victoria en un clima templado encontraron que de la siembra a emergencia la ETc fue de 15 mm, de emergencia a antesis fue de 185 mm y de antesis a madurez fisiológica fue de 80 mm. Teniendo una ETc acumulada durante todo el ciclo del cultivo de 280 mm.

En el Tabla 1, se presenta el análisis de varianza de los factores de estudio y sus interacciones, en el cual muestra que la biomasa total (BT) y rendimiento de grano (RG) presentaron diferencias significativas para el suelo (S), nitrógeno (N), biofertilizante (BIO), S x N, S x BIO y N x BIO; mientras que en el IC se observó una nula significancia en las interacciones S x BIO y N x BIO. Con respecto al P100S la significancia se registró en el factor N, BIO y la interacción S x BIO, finalmente para AC no presentaron diferencias significativas las interacciones S x N, S x BIO y N x BIO.

Tabla 1. Biomasa total (BT), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG), peso de 100 semillas (P100S) y área de capítulo (AC), en función al tipo de suelo (S), nitrógeno (N) y biofertilizante (BIO).

Table 1. Total biomass (BT), harvest index (IC), grain yield (RG), 100 seeds weight (P100S) and chapter area (AC), as a function of soil type (S), nitrogen (N) and biofertilizer (BIO).

FACTOR	BT g m ⁻²	IC %	RG g m ⁻²	P100S g	AC cm ²
S	**	**	**	NS	**
N	**	**	**	**	**
BIO	**	*	*	*	**
S x N	*	**	*	NS	NS
S x BIO	*	NS	*	*	NS
N x BIO	*	NS	*	NS	NS
S x N x BIO	*	*	NS	NS	*

*= P ≤ 0.05, **= P ≤ 0.01, NS= Diferencias no significativas a P > 0.05.

Suelo

La producción de BT y RG más alta (Tabla 2) se observó en el suelo con una CE de 0.49 dS m^{-1} (S1), donde la producción se incrementó en 17 y 21 % respecto a S2, el cual presenta una CE de 1.75 dS m^{-1} ; tendencias similares se observó en el IC, P100S y el AC donde los mayores datos se encontraron en S1 por registrar una conductividad eléctrica más baja en comparación a S2. Dos-Santos et al. (2017) señalan que la reducción en la producción de las plantas en estrés salino se explica por exceso de acumulación de ciertos iones en los tejidos vegetales, disminución en el potencial osmótico de la solución del suelo, posible toxicidad iónica e inestabilidad nutricional. Al respecto Escalante y Rodríguez (2010), al evaluar girasol en suelos con diferentes grados de salinidad, encontraron que la producción de BT y RG se vio afectada en suelos con mayor salinidad.

Tabla 2. Biomasa total (BT), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG), peso de 100 semillas (P100S) y área de capítulo (AC), en función al suelo (S), nitrógeno (N) y Biofertilizante (BIO).

Table 2. Total biomass (BT), harvest index (IC), grain yield (RG), 100 seeds weight (P100S) and chapter area (AC), as a function of soil (S), nitrogen (N) and biofertilizer (BIO).

FACTOR	BT g m ⁻²	IC %	RG g m ⁻²	P100S g	AC cm ²
S1	1286 a	30 a	387 a	7.5 a	327 a
S2	1063 b	26 b	306 b	7.0 a	316 b
DMS	57.8	1.3	18.3	0.7	2.0
N0	967 b	30 a	304 b	6.6 b	289 b
N100	1381 a	26 b	390 a	7.9 a	354 a
DMS	89.2	1.0	18.0	0.1	24.8
BIO	1305 a	27 b	373 a	7.8 a	352 a
SBIO	1044 b	29 a	321 b	6.7 b	290 b
DMS	75.9	0.9	37.6	0.5	4.8
CV	3.7	1.7	5.02	3.2	3.5

*Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según Tukey = 0.05. Suelo 1 (S1), pH de 7.1 y CE de 0.49 dS m^{-1} , suelo 2 (S2), pH de 7.8, CE de 1.75 dS m^{-1} . SBIO = Sin Biofertilizante, BIO = Con biofertilizante; N0 y N100 = 0 y 100 kg de N ha⁻¹.

Nitrógeno

En respuesta al N, la BT y RG se incrementó en un 42 y 28 % respecto a la cero fertilización. Cabe señalar, que con la aplicación N también se logró aumentar el P100S y AC, lo que está relacionado con un mayor rendimiento de grano. En estudios realizados por Ali et al. (2012) y Nasim et al. (2012) al evaluar diferentes niveles de nitrógeno en girasol, encontraron que conforme la fertilización fue aumentando también lo hacía la BT y el RG. Lo anterior, indica que la generación de materia seca está directamente relacionada con la disponibilidad y aprovechamiento de los nutrientes en el suelo (nitrógeno). El nitrógeno es el elemento más requerido por las plantas, ya que representa de 1 a 5 % de la biomasa total y es constituyente integral de proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, coenzimas fitohormonas y metabolitos secundarios (Hawkesford et al., 2012).

Biofertilizante

La inoculación del biofertilizante en el cultivo de girasol generó un incremento en la BT y RG del 25 y 16 % respecto al testigo sin aplicar, respectivamente, el cual está relacionado con el aumento en el AC y P100S. Dicho aumento en la BT, RG y sus componentes puede deberse a una mayor área radical e incremento en actividad de esta, como la liberación de exudados hormonales provocados por la aplicación de *Azospirillum* sp. y *Glomus* sp. (Aguilar et al., 2015; Espinosa et al., 2019; Venegas et al., 2019). Ali et al. (2012), observaron que al suministrar biofertilizante (*Azotobacter* sp. y *Azospirillum* sp.) en el cultivo de girasol se logró incrementar la biomasa total y rendimiento de grano en 10 % respecto a la nula biofertilización. Estos resultados corroboran el hecho de que el uso de microorganismos (biofertilizante) estimula a la planta para promover una mayor producción en el cultivo de girasol.

Interacción Suelo x Nitrógeno

En general los dos tipos de suelo presentaron los valores de BT y RG más alta con la aplicación de 100 kg ha^{-1} de nitrógeno en comparación a 0 kg ha^{-1} de nitrógeno, siendo este último donde se obtuvo la producción más baja (Figura 3). Al respecto Rasool et al. (2013), al evaluar diferentes niveles de nitrógeno lograron aumentar la BT y RG, tendencias

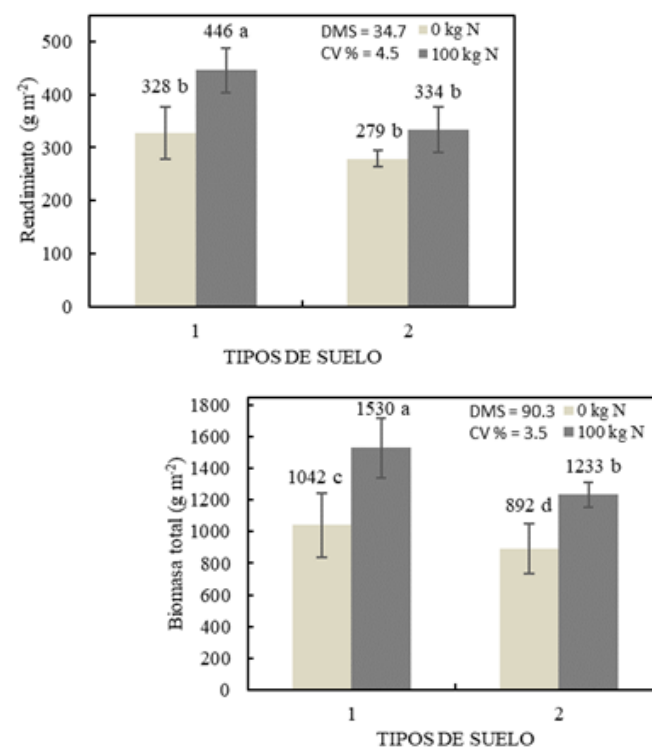


Figura 3. Biomasa total y rendimiento de grano en función del suelo y nitrógeno (N). Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas, según Tukey = 0.05. Suelo 1: pH de 7.1 y CE de 0.49 dS m^{-1} , suelo 2: pH de 7.8, CE de 1.75 dS m^{-1} .

Figure 3. Total biomass and grain yield as a function of soil and nitrogen (N). Different letters on columns indicate significant differences, according to Tukey = 0.05. Soil 1: pH of 7.1 and CE of 0.49 dS m^{-1} , soil 2: pH of 7.8, CE of 1.75 dS m^{-1} .

similares al presente estudio. El suelo que presentó la mayor producción de BT y RG fue S1 (pH de 7.1 y CE de 0.49 dS m⁻¹) con la aplicación de 100 kg ha⁻¹ de nitrógeno, donde el incremento fue de 71 y 60 %, respecto a la nula aplicación de nitrógeno y suelo con mayor salinidad como el de S2 (pH de 7.8 y CE de 1.75 dS m⁻¹), el cual registró la menor BT y RG. Lo anterior, se debió a que los niveles altos de salinidad disminuyen los parámetros de crecimiento y producción agrícola, debido a la disminución de la actividad fotosintética, modificaciones morfológicas, estructurales y metabólicas en las plantas (Conus *et al.*, 2009; Dos-Santos *et al.*, 2017).

Interacción Suelo x Biofertilizante

En la interacción S x BIO (Figura 4), se puede observar que con el uso del biofertilizante se logró aumentar la producción de biomasa total y rendimiento de grano, siendo más evidente en S1, en donde el incremento fue del 25 (BT) y 20 (RG) % respecto a S2. El uso de biofertilizante posiblemente estimuló la producción de sustancias promotoras del crecimiento (hormonas y enzimas), lo cual generó un incremento en la biomasa de la planta de girasol como lo indica Ahmed y El-Araby (2012). Cabe señalar, que S1 presenta un suelo con pH neutro (pH de 7.1) y CE de 0.49 dS m⁻¹, condiciones posiblemente óptimas para el desarrollo de la planta, ya que el aumento en la salinidad produce una reducción en

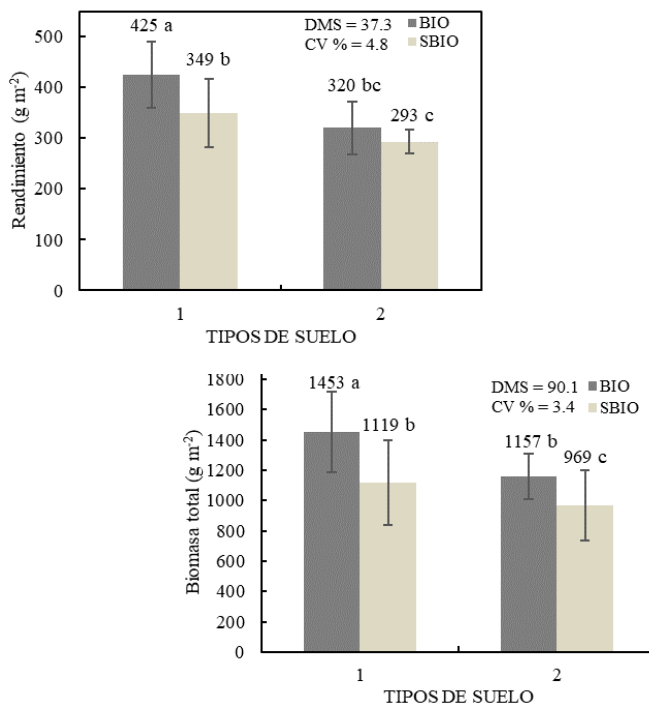


Figura 4. Biomasa total y rendimiento de grano en función del suelo y biofertilizante (BIO) (Con y Sin Biofertilizante). Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas, según Tukey = 0.05. Suelo 1: pH de 7.1 y CE de 0.49 dS m⁻¹, suelo 2: pH de 7.8, CE de 1.75 dS m⁻¹.

Figure 4. Total biomass and grain yield as a function of soil and biofertilizer (BIO) (With and without Biofertilizer). Different letters on columns indicate significant differences, according to Tukey = 0.05. Soil 1: pH of 7.1 and CE of 0.49 dS m⁻¹, soil 2: pH of 7.8, CE of 1.75 dS m⁻¹.

la BT y RG, como se pudo observar al comparar S1 contra S2. Por lo que, la reducción del crecimiento de las plantas está relacionada con el exceso de acumulación de ciertos iones en los tejidos vegetales, causado por una posible toxicidad iónica (salinidad) e inestabilidad nutricional en el suelo (Dos-Santos *et al.*, 2017).

Interacción Nitrógeno x biofertilizante

Para la combinación de N x BIO (Figura 5), se observó que al aplicar de 100 kg ha⁻¹ de nitrógeno la producción de biomasa total y rendimiento de grano se incrementó en un 57 y 28 % respecto a la nula fertilización, al incorporar el biofertilizante en los tratamientos con nitrógeno, se logró que la biomasa total y rendimiento de grano aumentara en un 21 y 26 % más, respecto a la fertilización de 100 kg ha⁻¹ de nitrógeno, valores semejantes registraron Jalilian *et al.* (2012), donde indican que con la aplicación del biofertilizante se promueve el crecimiento de la planta de girasol, lo que genera una mayor biomasa total y rendimiento de grano. Por su parte Madhurendra *et al.* (2009), mencionan que con la aplicación de 100 kg de N ha⁻¹ + *Azospirillum* y *Azotobacter* se eleva el rendimiento de grano en comparación a solo la fertilización nitrogenada.

Interacción Suelo x Nitrógeno x Biofertilizante

En la interacción S x N x BIO (Tabla 3), se percibió que la mayor BT y RG se registró con la aplicación de N (100 Kg ha⁻¹) y biofertilizante, siendo más evidente en el Suelo 1, ya

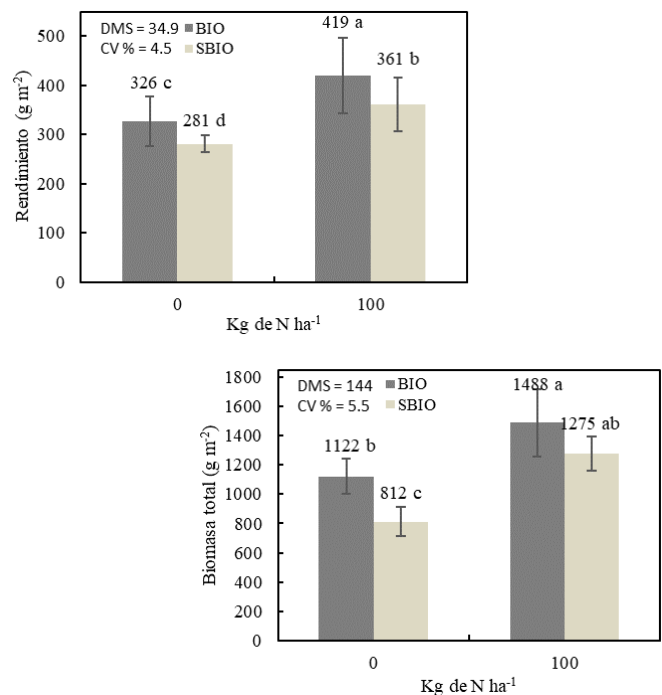


Figura 5. Biomasa total y rendimiento de grano en función del nitrógeno (N) y Biofertilizante (BIO) (Con y Sin Biofertilizante). Letras distintas en las columnas indican diferencias significativas, según Tukey = 0.05.

Figure 5. Total biomass and grain yield as a function of nitrogen (N) and Biofertilizer (BIO) (With and without Biofertilizer). Different letters on columns indicate significant differences, according to Tukey = 0.05.

Tabla 3. Biomasa total (BT), índice de cosecha (IC), rendimiento de grano (RG), peso de 100 semillas (P100S) y área de capítulo (AC), en función al suelo, nitrógeno (N) y Biofertilizante (BIO).

Table 3. Total biomass (BT), harvest index (IC), grain yield (RG), 100 seeds weight (P100S) and chapter area (AC), as a function of soil, nitrogen (N) and biofertilizer (BIO).

SUELO	N Kg ha ⁻¹	Bio fertilizante	BT g m ⁻²	IC %	RG g m ⁻²	P100S G	AC cm ²
1	0	BIO	1215 b	28 b	339 a	7 a	310 c
		SBIO	869 bc	29 ab	287 a	6 a	271 e
	100	BIO	1611 a	23 c	482 a	9 a	398 a
		SBIO	1368 ab	25 c	411 a	8 a	318 c
2	0	BIO	1029 bc	30 a	284 a	6 a	308 d
		SBIO	756 c	32 a	255 a	6 a	257 f
	100	BIO	1285 ab	28 b	357 a	8 a	385 b
		SBIO	1181 abc	30 a	311 a	7 a	315 cd

†Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas, según Tukey = 0.05. Suelo 1: pH de 7.1 y CE de 0.49 dS m⁻¹, suelo 2: pH de 7.8, CE de 1.75 dS m⁻¹. SBIO = Sin Biofertilizante, BIO = Con biofertilizante.

que la producción fue 20 y 26 % mayor a la del Suelo 2. El RG más alto está relacionado con el P100S y AC, componentes que mostraron un efecto positivo con el uso del biofertilizante en condiciones menos salinas (Prabhakaran *et al.*, 2019). Cabe indicar, que el biofertilizante se vio favorecido por las condiciones del suelo en las que se desarrolló el cultivo. Esto señala, el hecho de que suelos con una mayor salinidad limitan el crecimiento de las plantas, incluso podría causar la muerte de está. Los efectos estimulantes de los microorganismos están relacionados con la producción de fitohormonas, que pudieran estimular la absorción de nutrientes y agua, lo que conduce a un mayor crecimiento y rendimiento de las plantas (Madhurendra *et al.*, 2009; Jalilian *et al.*, 2012). En lo que respecta al IC, tanto el Suelo 1 como en el Suelo 2, la aplicación de solo el nitrógeno (100 kg ha⁻¹) generó una mayor eficiencia en la acumulación de materia seca hacia el grano, ya que presentó los mayores porcentajes. Tendencias similares obtuvieron Aguilar *et al.* (2017) en el cultivo de maíz y encontraron que donde se aplicó nitrógeno el IC era más alto en comparación a las asociaciones entre nitrógeno y biofertilizantes.

Rentabilidad económica

En la Tabla 4, se presenta el análisis económico sobre la comercialización para el rendimiento de grano en el cultivo de girasol. Tanto en el suelo 1, como en el suelo 2 se observó que con la aplicación de 100 kg ha⁻¹ de nitrógeno en mezcla con el biofertilizante se obtuvo el costo total más alto, mismo que se amortizó con el ingreso total; de tal manera que generó el mayor ingreso neto y GPI, ya que por cada peso invertido en la producción de girasol se recuperó \$ 5.80 y \$ 4.00, en el suelo 1 y 2, respectivamente. La ganancia por peso invertido más baja se obtuvo en el suelo 2 con la aplicación de 100 kg de N ha⁻¹ y sin biofertilizante que fue de \$ 3.50, sin embargo, al realizar la aplicación del biofertilizante, se logra

Tabla 4. Rendimiento de grano (RG), ingresos totales (IT), costos fijos (CF), costos variables (CV), costos totales (CT), ingresos netos (IN) y ganancia por peso invertido (GPI) en girasol en función al suelo, biofertilizante (BIO) y nitrógeno (N).

Table 4. Grain yield (RG), total income (IT), fixed costs (CF), variable costs (CV), total costs (CT), net income (IN) and invested peso gain (GPI) as a function of soil, biofertilizer (BIO) and nitrogen (N), in the sunflower crop.

SUELO	N kg ha ⁻¹	BIO	RG Kg ha ⁻¹	IT \$	CF \$	CV \$	CT \$	IN \$	GPI \$
1	0	BIO	3690	73800	9600	2000	11600	62200	5.30
1	0	SBIO	2870	57400	9600	1600	11200	46200	4.10
1	100	BIO	4820	96400	9600	4560	14160	82240	5.80
1	100	SBIO	4110	82200	9600	4160	13760	68440	4.90
2	0	BIO	2840	56800	9600	2000	11600	45200	3.80
2	0	SBIO	2750	55000	9600	1600	11200	43800	3.90
2	100	BIO	3570	71400	9600	4560	14160	57240	4.00
2	100	SBIO	3110	62200	9600	4160	13760	48440	3.50

IT = RG x precio por kg de girasol (\$ 20.00). CF = incluye costo de preparación del terreno, siembra, riego, manejo de maleza y plagas. CV = incluye el costo del biofertilizante y fertilizante inorgánico.

incrementar la GPI en el suelo 2 donde presenta una mayor salinidad en comparación al suelo 1. Al respecto, Escalante *et al.* (2007) al evaluar diferentes niveles de nitrógeno en girasol observaron una tendencia a incrementar la GPI, a medida que se aumentaba la fertilización. Por lo que, se recomienda la aplicación de nitrógeno en asociación con biofertilizante, alternativa que genera un mayor ingreso neto en el cultivo de girasol.

CONCLUSIONES

Para los suelos en estudio se encontró que la fertilización nitrogenada y el biofertilizante no modificaron el tiempo a ocurrencia de las etapas fenológicas, pero sí se observó un cambio en la biomasa total y rendimiento de grano, donde la mayor producción se registró con la aplicación de nitrógeno a 100 kg ha⁻¹ y la inoculación del biofertilizante, principalmente en las condiciones con menor salinidad. El mayor ingreso neto se logró con la aplicación de 100 kg ha⁻¹ de nitrógeno y biofertilizante, en el suelo con la salinidad más baja.

REFERENCIAS

- Aguilar, C.C., Escalante, E.J.A.S., Aguilar, M.I., Mejía, C.J.A., Conde, M.V.F. y Trinidad, S.A. 2015. Rendimiento y rentabilidad de maíz en función del genotipo, biofertilizante y nitrógeno, en clima cálido. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 18: 151-163.
- Aguilar, C.C., Escalante, E.J.A.S., Aguilar, M.I. y Pérez, R.A. 2017. Crecimiento, rendimiento y rentabilidad del maíz VS-535 en función del biofertilizante y nitrógeno. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 4: 475-483.
- Ahmed, H.F.S. y El-Araby, M.M.I. 2012. Evaluation of the influence of nitrogen fixing, phosphate solubilizing and potash mobilizing biofertilizers on growth, yield, and fatty acid constituents of oil in peanut and sunflower. *African Journal of Biotechnology*. 11: 10079-10088.

- Ali, N., Teymur, K. y Mona, S. 2012. Effects of bio and chemical nitrogen fertilizer on grain and oil yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) under different rates of plant density. *Annals of Biological Research*. 3: 1125-1131.
- Bueno, J.J.E., Alonso, L.A., Volke, H.V., Gallardo, L.F., Ojeda, R.M.M. y Mosqueda, V.R. 2005. Respuesta del papayo a la fertilización con nitrógeno, fósforo y potasio en un luvisol. *Terra Latinoamericana*. 23:409-415.
- Conus, L.A., Cardoso, P.C., Venturoso, L.R. y Scalón, S.P.Q. 2009. Germinação de sementes e vigor de plântulas de milho submetidas ao estresse salino induzido por diferentes saís. *Rev. Bras. Sementes*. 31: 67-74.
- Doorenbos J. y Pruitt, W.O. 1986. Las necesidades del agua por los cultivos. 1er ed. Estudio FAO. Riego y Drenaje. Manual 24.
- Dos-Santos, J.B., Marengo-Centeno, C.R., Vieira de-Azevedo, C.A., Raj-Gheyi, H., De-Lima, G.S. y De-Lira, V.M. 2017. Crecimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.) en función de la salinidad del agua de riego con fertilización nitrogenada. *Agrociencia*. 51: 649-660.
- Escalante, E.L.E., Escalante, E.Y.I y Lizaga, E.C. 2007. La fertilización nitrogenada en el rendimiento del girasol en México. *Agronomía Costarricense*. 31: 95-100.
- Escalante, E.J.A. y Rodríguez, G.M.T. 2010. Sunflower biomass distribution and seed yield in saline soil of Mexico highlands. *HELIA*. 33: 127-134.
- Escalante-Estrada, J.A.S., Rodríguez-González, M.T. y Escalante-Estrada, Y.I. 2015. Fenología, biomasa y rendimiento de cultivares de girasol en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2: 307-311.
- Espinosa, P.B., Cano, R.P., Salas, P.L., García, H.J.L., Preciado, R.P., Sáenz, M.J. y Reyes, C.J.L. 2019. Bioinoculantes y concentración de la solución nutritiva sobre la producción y calidad de tomate. *Biocencia*. 21: 100-107.
- Flores, J.M., Chan J.L. y Bravo, L. 1985. Fenología del maíz y frijol en el altiplano de Zacatecas. II. Unidades calor (UC) y desarrollo fenológico. *Fitotecnia*. 7: 66-81.
- García, E. 2004. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 4ª. Edición. Instituto de Geografía. Universidad Autónoma de México.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Moller, I. S. y White, P. 2012. Functions of macronutrients. In: Marschner, P. (Ed.), *Marschner's Mineral Nutrition of higher plants*, pp 135-189. USA. Academic Press.
- Ishfaq, M., Ali, A., Khaliq, A. y Yaseen, M. 2009. Allometry, agronomic traits and yield of autumn planted sunflower hybrids under varying row spacing. *Pak. Journal Agriculture Science*. 46: 248-257.
- Jalilian, J., Modarres, S.S.A.M., Farhad, S.S. y Sadat A.K. 2012. Effects of the combination of beneficial microbes and nitrogen on sunflower seed yields and seed quality traits under different irrigation regimes. *Field Crops Research*. 127: 26-34.
- Martínez, V.N., López, A.C.V., Basurto, S.M. y Pérez, L.R. 2011. Efectos por salinidad en el desarrollo vegetativo. *Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable*. 5: 156-161.
- Madhurendra, Prasad, N. y Akhuri, R.K. 2009. Effect of biofertilizer on sunflower, *Helianthus annuus* L. *Indian Journal of Oilseeds Research*. 26: 167-177.
- Mena, L.J.L., Díaz, P.A.L. y Valdés, H.A. 2018. Efectos de dos biofertilizantes en el desarrollo del girasol. *Revista de Ciencias Agrarias*. 41: 933-944.
- Mishra, B.K. y Dadhich, S.K. 2010. Methodology of nitrogen biofertilizer production. *Journal Adv. Dev. Research*. 1: 3-6.
- Morales, R.E.J., Escalante, E.J.A., Tijerina, C.L., Volke, H.V. y Sosa, M.E. 2006. Biomasa, rendimiento, eficiencia en el uso del agua y de la radiación solar del agrosistema girasol-frijol. *Terra Latinoamericana*. 24: 55-64.
- Nasim, W., Ahmad, A., Bano, A., Olatinwo, R., Usman, M., Khaliq, T., Wajid, A., Hammad, H. M., Mubeen, M. y Hussain, M. 2012. Effect of Nitrogen on Yield and Oil Quality of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Hybrids under Sub Humid Conditions of Pakistan. *American Journal of Plant Sciences*. 3: 243-251.
- Prabhakaran, R., Borboa, F.J., Rosas, B.E.C., Cárdenas, L.J.L., Ortega, G.J. y Rueda, P.E.O. 2019. *Phaseolus acutifolius* associated with *Bacillus amyloliquefaciens* and *Azospirillum halopraeferens* under salinity conditions. *Biocencia*. 21: 127-132.
- Rasool, F.U., Hassan, B. y Jahangir, I.A. 2013. Growth and yield of sunflower (*Helianthus annuus* L.) as influenced by nitrogen, sulphur and farmyard manure under temperate conditions. *SAARC Journal of Agriculture*. 11: 81-89.
- Sadras, V.O. y Hali, A.J. 1988. Quantification of temperature, photoperiod and population effect on plant leaf area in sunflower crop. *Field Crop Research*. 18: 185-196.
- SAS Institute. 2004. SAS User's Guide. Statistics. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Schneider, A. y Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Science*. 21: 901-903.
- SIAP (Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera) [Consultado 10 diciembre 2018] 2018. Producción agrícola de cultivos cíclicos y perennes. Disponible en: www.siap.gob.mx
- Sotelo, C.E., Zalocar, Y., Cándida, I.M., Collavino, M., Grasso, D., Cassan, F. 2016. Biofertilización con cianobacterias (*Nostoc* sp.). Efecto sobre el rendimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.), en suelos del Chaco. *Agrotecnia*. 23: 21.
- Tapia, G.J.J., Ferrera, C.R., Varela, F.L., Rodríguez, O.J.C., Soria, C.J.C., Tiscareño, I.M.A., Loreda, O.C., Alcalá, J.J. y Villar, M.C. 2010. Inefectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Revista Mexicana de Micología*. 31: 69-74.
- Venegas, G.J., Méndez, I.C., Martínez, M.E.K., Ceja, T.L.F. y Rodríguez, T.M.D. 2019. Producción orgánica de *Beta vulgaris* subespecie *cicla* con inoculantes microbianos. 21: 121-126.
- Werteker, M., Lorenz, A., Johannes, H., Berghofer, E. y Findlay, C.S. 2010. Environmental and Varietal Influences on the Fatty Acid Composition of Rapeseed, Soybeans and Sunflowers. *J. Agronomy & Crop Science. Austrian Agency for Health and Food Safety*. 196: 20-27.
- Zarabi, M., Alahdadi, I., Akbari, G.A. y Akbari, G.A. 2011. A study on the effects of different biofertilizer combinations on yield, its components and growth indices of corn (*Zea mays* L.) under drought stress conditions. *African Journal Agriculture Research*. 6: 681-685.

Efecto de la adición de subproductos agroindustriales en las propiedades físicas de un bioplástico almidón-gelatina

Effect of agro-industrial by-products addition on the physical properties of a starch-gelatin bioplastic

Blanca Aurora Francisco Ponce¹, Isamar Maydeth Vidal Silva¹, Yanik Ixchel Maldonado Astudillo², Javier Jiménez Hernández², Verónica Flores Casamayor², Gerónimo Arámbula Villa², Ricardo Salazar^{4*}

¹ Facultad de Ciencias Químico-Biológicas. Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázaro Cárdenas s/n. Ciudad Universitaria Sur, Col. La Haciendita, 39090. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

² Centro de Innovación, Competitividad y Sostenibilidad (CICS). Universidad Autónoma de Guerrero. Calle Pino S/N Col. El Roble, 39640. Acapulco, Guerrero, México.

³ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV IPN), Unidad Querétaro, Libramiento Norponiente # 2000, Fraccionamiento Real de Juriquilla, 76230. Querétaro, Querétaro, México.

⁴ CONACYT-Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Javier Méndez Aponte No. 1, Fracc. Servidor Agrario, 39070. Chilpancingo de los Bravo, Guerrero, México.

RESUMEN

En este trabajo se reporta el efecto de la adición de subproductos de mango, jamaica y café a una formulación de almidón-gelatina para elaborar un bioplástico en forma de cuchara. Se encontró que la adición de los subproductos mejoró las propiedades mecánicas del bioplástico debido a la compatibilidad de sus componentes observados a nivel microscópico (la dureza aumentó de 190 hasta 290 N). Asimismo, las propiedades físicas de los bioplásticos como el ángulo matiz (63-89), y los índices de solubilidad y absorción en agua se modificaron por la adición de subproductos. Se observó que las condiciones de máxima estabilidad de los bioplásticos obtenidas a partir del modelado de las isoterma de adsorción a 35 °C con la ecuación de GAB y el cálculo el volumen de microporo correspondieron a una actividad de agua cercana a 0.40, independientemente del subproducto agregado. Las distintas formulaciones exhibieron un evento endotérmico a una temperatura de 180°C, asociado a un proceso de fusión, así como una elevada tasa de degradación en suelo después de 120 h. Los subproductos probaron ser un refuerzo en la formulación de bioplásticos. El uso de subproductos de mango, café y jamaica representan una alternativa interesante para incrementar su potencial tecnológico.

Palabras clave: Subproducto; Bioplástico; Características físicas.

ABSTRACT

This study reports the effect of mango, jamaica and coffee by-products addition into formulation of starch-gelatin for elaborating a spoon-shaped bioplastic. Such additions improved the bioplastics mechanical properties due to the compatibility of their components, observed at microscopic level (hardness was increased in a range of 190 to 290 N). In the same way, the bioplastics physical properties such as the hue angle values (63-89), solubility and absorption index, were modified with the by-product's addition. To

obtain the spoon-shaped bioplastics conditions of maximum stability ($a_w \approx 0.4$) at 35 °C, we employ the GAB equation and the moisture content corresponding to micropore volume. The different formulations exhibited an endothermic event at 180°C, associated with a melting process, as well as a high degradation rate in soil after 120 h. The by-products proved to be a reinforcement in the bioplastics formulation. The use of by-products of mango, coffee and jamaica represent an interesting alternative to increase their technological potential.

Keywords: By-product, Biopolymer, Physical properties

INTRODUCCIÓN

En la actualidad los plásticos convencionales a base de petróleo constituyen una grave amenaza ambiental en todo el mundo. Esto se debe al hecho de que proceden de combustibles fósiles no renovables y su acumulación en suelos y mares ocasiona altos niveles de contaminación porque no pueden ser fácilmente degradados por el entorno. Actualmente se estima que aproximadamente 8 millones de toneladas de plásticos desechados terminan en el océano cada año (Krishnamurthy y Amritkumar, 2019) y se espera que esta cifra continúe aumentando debido al uso generalizado de productos de origen petroquímico como el tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), polietileno (PE) y polipropileno (PP). Por esta razón, la creciente preocupación por la contaminación ambiental originada por los plásticos convencionales ha inspirado el desarrollo de plásticos biodegradables derivados de fuentes renovables como son los polímeros naturales (ácido poliláctico, polihidroxibutiratos, polihidroxialcanoatos, almidón, quitosano, entre otros) (Brizga *et al.*, 2020). La biodegradabilidad se define como la descomposición natural y no contaminante de un producto por la acción de agentes biológicos (Imam *et al.*, 2000).

El almidón es el polímero natural más utilizado en la fabricación de plásticos biodegradables por su renovabilidad, disponibilidad y bajo costo (Lubis *et al.*, 2018), debido a que

se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza al ser el principal polisacárido de reserva energética en plantas; no obstante, su uso individual proporciona bioplásticos con propiedades insatisfactorias en aplicaciones comerciales como el servicio, empaque o envasado de alimentos y bebidas. Entre las principales desventajas asociadas a los bioplásticos de almidón, en comparación con los plásticos convencionales actualmente en uso, se citan una limitada estabilidad dimensional cuando son expuestos a la humedad; descomposición térmica a bajas temperaturas (Avérous y Boquillon, 2004; Yang *et al.*, 2019); y propiedades mecánicas inferiores como una menor resistencia a la tracción y alargamiento (Krishnamurthy y Amritkumar, 2019).

Un enfoque para mejorar las características de los bioplásticos de almidón es la adición como refuerzo de fibras vegetales como la celulosa, hemicelulosa y lignina, principalmente debido a su amplia disponibilidad, biodegradabilidad, y atractivas propiedades mecánicas (ductilidad y elevada resistencia a la fractura). Diversos estudios recientes han demostrado que la adición de fibras lignocelulósicas incrementa la resistencia de bioplásticos elaborados a partir de almidón (Yang *et al.*, 2019).

Por otra parte, en los últimos años ha adquirido especial importancia el uso de residuos de agricultura en forma de semillas, cáscara y bagazo como fuente potencial de fibra debido a que se trata de materiales abundantes, generalizados y fácilmente disponibles. La utilización de residuos agrícolas además proporciona ventajas importantes como la reducción de los costos y una menor necesidad de la gestión tradicional de los desechos, favoreciendo la economía, el medio ambiente y la tecnología a largo plazo (Ashori y Nourbakhsh, 2010; Väisänen *et al.*, 2016).

Diversos autores han reportado el uso de subproductos agrícolas en matrices poliméricas, como la adición de bagazo de caña, de agave, fique, yute, entre otros (Velásquez *et al.*, 2016; Aranda *et al.*, 2015) donde se ha observado una mejora de sus propiedades mecánicas, térmicas, así como una mayor compatibilidad de sus componentes a nivel microscópico (la hidrofiliidad y el débil entrecruzamiento de las fibras incrementa la adhesión interfacial de los componentes dentro de la matriz polimérica). Williamson y Hatzakis (2019), demostraron que los lípidos extraídos de los residuos del café son ingredientes promisorios en la elaboración de bioplásticos. En el mismo sentido, Moro *et al.* (2019), reportaron que la adición de cáscara de maracuyá mejoró las propiedades mecánicas de un bioplástico preparado a partir de almidón extrudido. Sin embargo, a pesar de los estudios exitosos reportado en la literatura, todavía se requieren estudios para la revalorización de subproductos agroindustriales como agentes de refuerzo para la mejora de las características de bioplásticos elaborados a base de almidón. Se sabe que las fibras de cáscara de mango, cáliz de jamaica y residuos de café tostado son ricos en fibras como celulosa, hemicelulosa y lignina, así mismo estos no poseen valor económico (McNutt, 2019; Mayo-Mayo *et al.*, 2020) por lo que representan un recurso sostenible para la producción de bioplásticos.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la adición de subproductos de mango, jamaica y café en las propiedades físicas (color, textura, morfología, actividad de agua, adsorción de humedad, transiciones térmicas, absorción y solubilidad en agua) de un bioplástico de almidón de maíz y gelatina utilizado para obtener cucharas biodegradables.

MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo de estudio fue experimental, se utilizó cáscara de mango (*Mangifera indica*), cáliz de jamaica cocido (*Hibiscus sabdariffa*) y residuos de café tostado (*Coffea arabica*) que se colectaron en el municipio de Chilpancingo del estado de Guerrero, México. La recolección en bolsas de plástico de los residuos de cáscara de mango criollo y cálices cocidos de jamaica se realizó en un mercado local, y los residuos de café tostado se recolectaron en una cafetería local. Se utilizó almidón ceroso de maíz suministrado por Ingredion®. El ácido clorhídrico (HCl), el hidróxido de sodio (NaOH), el glicerol y las sales usadas para la elaboración de las isoterms de adsorción se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EU) o Golden Bell reactivos (Zapopan, Jalisco, México) y fueron grado analítico.

Procesamiento de los subproductos

Los residuos de café tostado se secaron en un horno de convección forzada y capacidad de 30 L (Luzeren modelo DHG-9070A, Beijing, China) a 60°C durante 24 horas. La cáscara de mango y el cáliz cocido de jamaica se sometieron a inactivación enzimática mediante ebullición en agua durante 5 min, posteriormente se colocaron en un horno de convección forzada a 60°C durante 48 horas. Por último, los residuos fueron pulverizados en un molino de café (KRUPS modelo GX410011, Solingen, Germany), tamizados en una malla con una apertura de 425 µm y almacenados en frascos herméticamente cerrados y cubiertos de la luz a temperatura ambiente (≈25°C) (Mayo-Mayo *et al.*, 2020).

Hidrólisis de almidón

Se preparó una solución al 30% en peso de almidón, adicionando 4% de HCl y el resto de agua destilada. La solución se agitó de forma constante a una velocidad de 500 rpm en un agitador mezclador de propela 20L (OS20-S, DLAB Scientific Co., Ltd., China) a 40°C durante 3 horas. Se ajustó el pH a 5.5 adicionando NaOH, utilizando un potenciómetro (Starter-3100, Ohaus, NJ, EE. UU) y se refrigeró durante 24 horas. La mezcla se repartió en tubos cónicos Falcon de 50 mL y se centrifugaron (centrífuga Eppendorf modelo 5810R, Hamburgo, Alemania) a 1800 x g por 5 min. Posteriormente, se descartó el sobrenadante para recuperar el sedimento, y resuspender en agua. El proceso anterior se llevó a cabo cuatro veces. El almidón resultante se secó durante 24 horas en un horno de convección forzada, se pulverizó y almacenó a temperatura ambiente (García-Gurrola *et al.*, 2019).

Elaboración del biopolímero

Se estableció la formulación de los bioplásticos a partir de almidón de maíz hidrolizado de acuerdo con Rodríguez *et al.* (2014). Brevemente, se realizó una solución 1:1 de almidón hidrolizado y gelatina (15 g de cada uno), adicionando 50 mL de agua destilada y 0.2 g de glicerol (plastificante) como tratamiento control. Se realizaron 3 tratamientos adicionando 2 g de cada subproducto. La mezcla se calentó a 60°C, se vació en moldes de silicón y finalmente se secó por 24 horas a 40°C, obteniéndose los bioplásticos. Las muestras elaboradas y su codificación fueron: tratamiento control de almidón de maíz (C), adición de cáscara de mango (CM), adición de cáliz de jamaica cocido (CJ), adición de residuos de café tostado (CC).

Análisis Físicos

El color se analizó mediante un colorímetro portátil (X- Espectrofotómetro Rite Modelo Ci62, X-Rite Incorporated, Grandville, MI, EE. UU.). El ángulo de Hue (H *) se calculó a partir de los valores determinados de CIE L*, a* y b*: $H^\circ = \tan^{-1}(b^*/a^*)$, donde a* = [negativo (verde) a positivo (rojo)] y b* = [negativo (azul) a positivo (amarillo)]. El iluminante empleado fue D65 y la posición estándar del observador fue 10°. La fuerza de fractura (FF) se determinó con un analizador de textura (Stable Micro Systems modelo TA-XT plus, Godalming, Reino Unido) con una sonda tipo punzón (ángulo de punta de 22°) a una velocidad de ensayo 2 mm s⁻¹. La actividad de agua (a_w) se evaluó a 25°C con un medidor de actividad de agua de punto de rocío Aqualab® 4te (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, EE. UU.).

Índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA)

La capacidad de absorción de agua de los bioplásticos se midió de acuerdo con el método estándar ASTM (2005). Se dispersó 2.5 g de muestra triturada de cada tratamiento en 40 mL de agua destilada en un tubo cónico y se colocó en baño maría a 40 °C durante 1 hora. El tubo se centrifugó a 1800 x g durante 20 minutos a una temperatura de 27° C. El gel sedimentado se separó por decantación y lo floculado se drenó en tubos de metal y se evaporó durante 24 horas a 80 °C. El Índice de solubilidad en agua (ISA) e Índice de absorción de agua (IAA) se calcularon de la siguiente manera:

$$ISA = \frac{\text{Peso del residuo de evaporación (g)}}{\text{Peso seco de la muestra (g)}} \times 100 \quad (1)$$

$$IAA = \frac{\text{Peso del residuo seco (g)}}{\text{Peso de la muestra inicial (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Morfología

Se utilizó un Microscopio Electrónico de Escaneo Ambiental (ESEM, modelo Philips XL30 con un haz de 3 kV y un detector gaseoso de electrones secundarios. Las imágenes se tomaron a 500X y 1 Torr. Las muestras se recubrieron con grafito utilizando un pulverizador JFC-1100 (JEOL, Akishima, Japón).

Isotermas de adsorción

Se realizaron por duplicado a 35 °C. Los datos de adsorción de humedad se obtuvieron por el Método Gravimétrico. Las muestras se colocaron en celdas de equilibrio que contenían soluciones saturadas que proporcionaron un rango de a_w de 0.108 a 0.821; se determinó la variación en el peso que denotaba la adsorción de humedad hasta llegar al equilibrio. El modelo Guggenheim-Anderson-De Boer (GAB) se utilizó para ajustar los datos experimentales de las isotermas de adsorción (Al-Muhtaseb *et al.*, 2004) de los bioplásticos:

$$M = \frac{M_0 C K a_w}{(1 - K a_w)(1 - K a_w + C K a_w)} \quad (3)$$

Donde: M (g H₂O/100 g s.s.) el contenido de humedad en equilibrio, a_w es la actividad de agua, M₀ (g H₂O/100 g s.s.) es el contenido de humedad teórico de la monocapa, C y K son constantes.

Para la determinación del contenido de humedad correspondiente al volumen de microporo (n₀) se utilizó la ecuación de Dubinin-Radushkevich (DR):

$$\log n = \log n_0 - B \log^2 \left(\frac{Pv^\circ}{Pv} \right) \quad (4)$$

Donde: n (g H₂O/100 g s.s.) el contenido de humedad en equilibrio, n₀ (g H₂O/100 g sólido seco) el volumen total de microporos accesibles al adsorbato, B una constante relativa a la estructura microporosa del adsorbente, Pv° es la presión de vapor del agua pura y Pv la presión de vapor del agua en el adsorbente.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó un equipo DSC (Mettler-Toledo®), modelo 821e, Suiza) controlado por el software STARE versión 10.0. Se pesó 6 mg de muestra en un crisol de aluminio y se sometió a una rampa de calentamiento con un rango de temperatura de 30-350 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

Prueba de degradación en suelo

Los biopolímeros fueron sumergidos en suelo a una HR=100% durante 5 días, donde se analizaron visualmente a las 0, 48 y 120 horas (López-Velázquez *et al.*, 2019).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados como medias y desviación estándar (Media±DS). Se utilizó un análisis de varianza ANOVA de una vía. La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey (p<0.05) utilizando el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics 25.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del biopolímero

Se desarrollaron y caracterizaron bioplásticos de almidón, gelatina y glicerol en forma de cucharas adicionadas con cáscara de mango (CM), residuos de café tostado (CC) y cáliz de jamaica cocidos (CJ) (Figura 1).

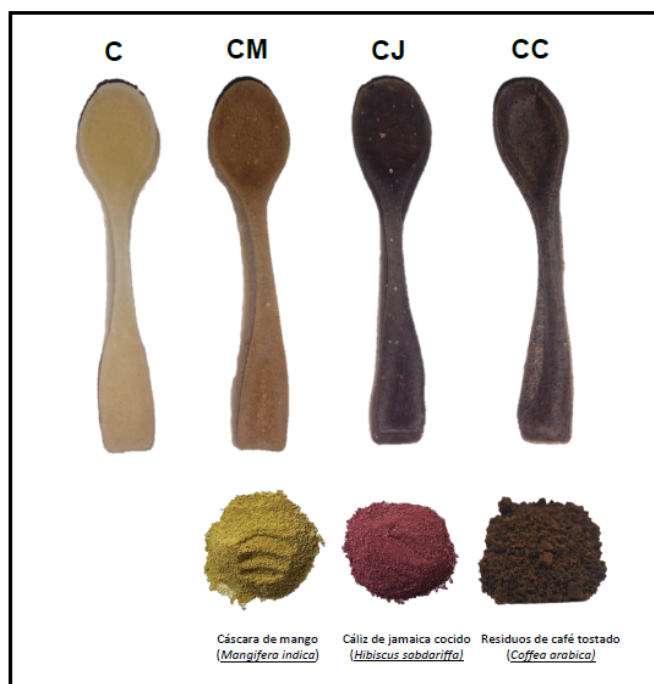


Figura 1. Bioplásticos obtenidos por la adición de subproductos de mango, jamaica y café. Control (C), cáscara de mango (CM), cálices de jamaica cocidos (CJ), residuos de café tostado (CC)

Figure 1. Bioplastics obtained by the addition of mango, roselle and coffee by-products. Control (C) mango peel (CM), decocted roselle calyces (CJ), spent coffee grounds (CC)

Los resultados de las pruebas de color y textura se muestran en la Tabla 1. Dado que el color es un factor importante en términos de apariencia general y aceptación por parte del consumidor, es necesario informar esta propiedad en los biopolímeros elaborados. Se observó que C exhibió el mayor valor de luminosidad ($L^*=58$) y el color más saturado ($C^*=18.8$), con un tono amarillo confirmado por el ángulo $H^\circ=89.24$, que se explica por la incorporación de la grenetina a la formulación, que posee un color amarillo característico. Como se esperaba, hubo un cambio de tonalidad, así como una disminución significativa en la luminosidad y cromaticidad de las cucharas en CM ($L^*=28.61$, $C^*=14.42$), CJ ($L^*=21.41$, $C^*=4.63$) y CC ($L^*=28.84$, $C^*=5.41$), por efecto de la adición de los residuos, que es consistente con la coloración propia de los mismos. Los residuos de mango, jamaica y café mostraron

una coloración café claro, rojo y café oscuro respectivamente. Esta disminución también se favoreció por reacciones de oscurecimiento no enzimático y la degradación de algunos pigmentos como los carotenoides y las antocianinas presentes en los subproductos por las condiciones de pH y temperatura que tienen lugar durante el procesamiento. Resultados similares han sido reportados por Santillán-Moreno *et al.* (2011), quienes registraron cambios en las tonalidades de mezclas extruidas de almidón de maíz y proteína de suero de leche debido a la adición de fibra de agave (valores mayores de luminosidad en las mezclas con bajo contenido de fibra) debido a la coloración propia de los ingredientes y al oscurecimiento por cambios químicos ocurridos durante el procesamiento.

El análisis de la fuerza de fractura (FF) se utiliza para estimar la resistencia y dureza de matrices poliméricas. El menor valor de FF se observó en el bioplástico C (94.03 N), mientras que CM, CJ y CC mostraron un aumento de la dureza, en donde CM presentó la mayor FF (290.15 N), por lo que la adición de los subproductos de mango incrementó la resistencia de esta cuchara en 200%. Este comportamiento coincide con resultados reportados en la literatura sobre bioplásticos de almidón reforzados con diferentes tipos de fibras. Jumaidin *et al.* (2020) observaron una mejora significativa de la resistencia y el módulo de tracción en biopolímeros de almidón tras la incorporación de fibra de sisca (*Imperata cylindrica*). Syamani *et al.* (2020) observaron que la incorporación de fibra de celulosa aumentó la resistencia a la tracción hasta un 184% en un bioplástico a base de almidón de yuca, considerándose adecuado para competir en resistencia con el polímero sintético de polietileno de baja densidad. Este aumento en la rigidez de la matriz polimérica se ha atribuido a la compatibilidad del almidón con la fibra de los subproductos, debido a que la estructura química de ambos compuestos es relativamente polar y conduce a la formación de enlaces de hidrógeno entre los numerosos grupos hidroxilos (Wang *et al.*, 2018). La mejora en la resistencia del biopolímero varía dependiendo del origen, concentración y longitud de la fibra (Avérous y Boquillon, 2004; Gáspar *et al.*, 2005).

En la Tabla 2 se reportan los valores de IAA e ISA de los distintos bioplásticos elaborados. Cuando las moléculas de agua atacan los puentes de hidrógeno de los materiales los debilitan y disminuyen las propiedades funcionales de

Tabla 1. Evaluación de las características físicas de los bioplásticos.
Table 1. Evaluation of bioplastics physical characteristics.

Tratamiento	L^*	C^*	H°	FF (N)
C	58.08 ± 1.6 a	18.80 ± 0.4 a	89.24 ± 0.9 a	94.03 ± 16.5 d
CM	28.61 ± 1.8 b	14.42 ± 0.2 b	70.71 ± 0.6 b	290.15 ± 32.9 a
CJ	21.41 ± 1.6 c	4.63 ± 1.4 c	54.52 ± 2.3 d	249.40 ± 23.5 b
CC	28.84 ± 0.4 b	5.41 ± 1.6 c	66.11 ± 2.8 c	190.22 ± 37.1 c

Luminosidad (L^*), Croma (C^*), Ángulo Matiz (H°), Fuerza de fractura (FF), Control (C), cáscara de mango (CM), cálices de jamaica cocidos (CJ), residuos de café tostado (CC). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Tabla 2. Determinación del Índice de Solubilidad en Agua (ISA) e Índice de Absorción en Agua (IAA) y actividad de agua de los bioplásticos.**Table 2.** Determination of bioplastics Water Solubility Index (ISA), Water Absorption Index (IAA) and water activity.

Tratamiento	ISA (g sólido/100 g muestra)	IAA (g gel/100 g muestra)	Actividad de agua (a_w)
C	38.52 ± 0.7 b	4.61 ± 0.3 a	0.34 ± 0.01 a
CM	40.63 ± 0.8 a	2.18 ± 0.1 b	0.26 ± 0.04 c
CJ	40.77 ± 0.1a	2.53 ± 0.1 b	0.27 ± 0.02 c
CC	36.26 ± 0.8 c	2.69 ± 0.1 b	0.31 ± 0.01 b

Control (C), cáscara de mango (CM), cálices de jamaica cocidos (CJ), residuos de café tostado (CC). Letras distintas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

los mismos (Kaisangsri *et al.*, 2014). El bioplástico C mostró el mayor valor de IAA, en contraste CM exhibió el menor. Se puede apreciar que la adición de subproductos redujo significativamente los valores de IAA de los bioplásticos. Este comportamiento puede ser atribuido al incremento en el contenido de fibra insoluble presente en los subproductos que limita la absorción de agua en los bioplásticos (Abarca, 2010).

El ISA está relacionado con la presencia de enlaces covalentes o interacciones que reducen la solubilidad en agua de los bioplásticos (Kaisangsri *et al.*, 2014). En este sentido, los bioplásticos CM y CJ mostraron los valores del índice de solubilidad mayores. Estos resultados pueden ser explicados con base en la presencia de fibra y compuestos bioactivos solubles presentes en la cáscara de mango y en los cálices de jamaica cocidos (Mayo-Mayo *et al.*, 2020).

Se evaluó la a_w de los bioplásticos, definida como una medida de la reactividad del agua para llevar a cabo reacciones de deterioro, se considera factor importante para determinar la vida útil de diversos productos, ya que establece el límite para el desarrollo de microorganismos. Se ha reportado que los microorganismos sólo pueden proliferar en ambientes donde la a_w es mayor a 0.60 debido a la disponibilidad de agua que poseen para realizar procesos metabólicos (Lucas *et al.*, 2008). Todas las formulaciones presentan una a_w inferior (< 0.4), por lo que el riesgo de contaminación por proliferación de microorganismos disminuye en los bioplásticos.

La morfología de los biopolímeros se caracterizó para observar la compatibilidad entre los componentes de los bioplásticos (Figura 2). Se observó que la superficie presentaba diferencias por efecto de la adición de los subproductos. En la micrografía de C (Figura 2A) la morfología es más lisa y homogénea en comparación con las otras formulaciones. La estructura compacta observada del polímero de almidón es indicador de una mayor integridad estructural (Mali *et al.*, 2002).

Las micrografías (Figura 2B-D) de CM, CJ y CC revelaron en cambio, una morfología más heterogénea en comparación con C, observándose la formación de múltiples poros desiguales en la matriz polimérica, mientras que otras regiones eran más compactas y con menor rugosidad que la superficie de la cuchara C. La presencia de estas regiones con una dispersión más uniforme indicaba una fuerte adhesión

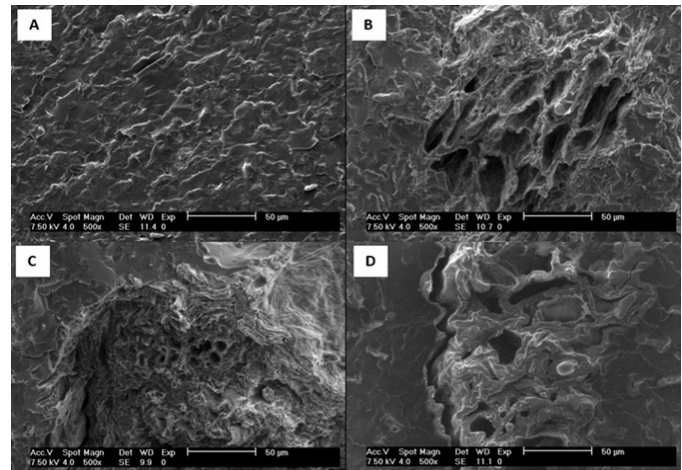
**Figura 2.** Microscopía electrónica de barrido. Superficie de los bioplásticos en forma de cuchara. A) C; B) CM; C) CJ; D) CC.

Figure 2. SEM micrographs. Surface morphology of spoon-shaped bioplastics. A) C; B) CM; C) CJ; D) CC.

entre el almidón y la fibra de los residuos agroindustriales. Este comportamiento es característico de los compuestos amiláceos biodegradables reforzados con fibras lignocelulósicas (Curvelo *et al.*, 2001). Torres *et al.* (2019) examinaron la morfología de un bioplástico desarrollado a base de almidón de papa y reforzado con cáscaras de castaña, y observaron una distribución homogénea del residuo agroindustrial lignocelulósico en la matriz polimérica, lo que sugería una adecuada interacción de los componentes.

Una buena adherencia entre el material de refuerzo y la matriz conduce a una interfaz resistente, provocando un aumento de su rendimiento mecánico (De Carvalho *et al.*, 2018), como permitieron comprobar los resultados del análisis de FF, donde la adición de los subproductos incrementó al doble la resistencia de las cucharas.

Por otra parte, la presencia de poros en la superficie de las cucharas se puede atribuir a la formación de agregados por efecto de la concentración de fibra en la formulación de las cucharas. Esto fue demostrado por De Carvalho *et al.* (2018), quienes observaron que la adición de 0.5% y 1% de fibra de bagazo de yuca a un biopolímero de almidón generó una matriz continua y cohesiva, pero un aumento de la concentración de material fibroso en 1.5% redujo la homogeneidad de la superficie generando poros y grietas en

la matriz polimérica por la formación de agregados de fibra. Por lo tanto, esto sugiere que es posible modificar la cantidad de fibra adicionada a la matriz de almidón con la finalidad de mejorar la interacción entre ambos componentes y obtener cucharas más compactas.

Establecimiento de las condiciones óptimas de almacenamiento

Las isoterms de sorción relacionan la a_w y humedad en equilibrio a una temperatura constante, permitiendo determinar su comportamiento bajo condiciones específicas. Esto es importante para conocer las condiciones óptimas de almacenamiento, secado y predecir la vida útil de un producto (Navia *et al.*, 2011). La Figura 3 muestra los datos experimentales de las isoterms de adsorción de humedad obtenidas en equilibrio a 35 °C. Se observó una forma de tipo III (no sigmoide) de acuerdo con Brunauer *et al.* (1940). Este comportamiento se debe al procesamiento dado, los cuales minimizan el área superficial del biopolímero al formar una película, disminuyendo su capacidad de adsorción de humedad (Gounavé *et al.*, 2006).

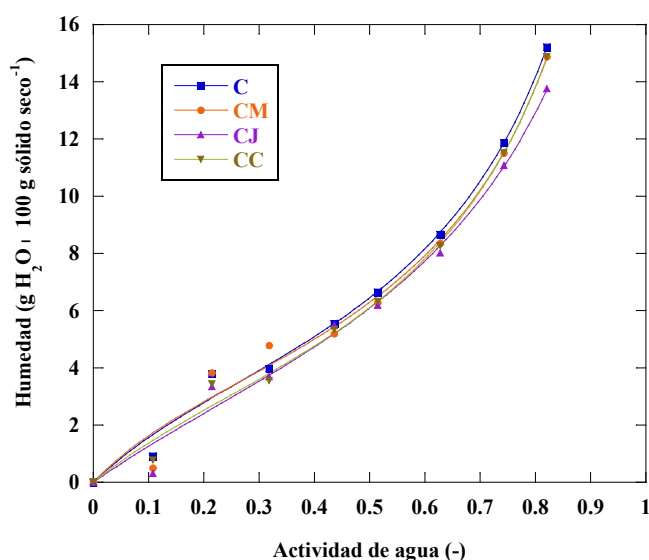


Figura 3. Isoterms de adsorción a 35°C de los bioplásticos. Control (C), cáscara de mango (CM), cálices de jamaica cocidos (CJ), residuos de café tostado (CC).

Figure 3. Bioplastics adsorption isotherms at 35 °C. Control (C) mango peel (CM), decocted roselle calyces (CJ), spent coffee grounds (CC).

La adsorción de vapor de agua en estos bioplásticos se atribuye a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo disponibles del almidón (Al-Muhtaseb *et al.*, 2004), debido a que su carácter polar condiciona su capacidad de adsorción en la superficie. Se observó que formulaciones establecidas presentaron alta capacidad de adsorción de agua en valores de $a_w > 0.3$ (4 g agua/100g sólido seco) y es similar a lo reportado por Peng *et al.* (2007), quienes evaluaron isoterms de adsorción del almidón de maíz en temperaturas similares. Este comportamiento se ve influenciado, entre otros factores, por el contenido de glicerol, debido a que su carácter hidrofílico incrementa las características higroscópicas de los bioplásticos (Mali *et al.*, 2002; Bertuzzi *et al.*, 2007). Sin embargo, se observó que los residuos adicionados no modificaron el tipo de las isoterms obtenidas.

Se determinaron los parámetros de la ecuación GAB (M_0 , C , K) (Tabla 3). En este estudio, el modelo GAB se ajustó satisfactoriamente a los datos experimentales. El modelo de GAB ha sido utilizado ampliamente para describir el comportamiento de las isoterms de adsorción de matrices alimentarias (Quirijns *et al.*, 2005), ya que sus constantes tienen un significado físico y es capaz de ajustar los datos experimentales hasta una a_w de 0.9. Sin embargo, el valor de M_0 obtenido del modelo GAB no es un indicador confiable de las condiciones óptimas de almacenamiento. En la mayoría de los casos, su aplicación debe ser corroborada experimentalmente (Maldonado *et al.*, 2019). El valor de monocapa (M_0) es la cantidad de agua necesaria para formar una capa de moléculas que cubren la superficie del bioplástico. En la monocapa, la energía de interacción entre las moléculas de agua y la superficie del bioplástico no permite que el agua sea reactiva y participe en reacciones de deterioro. Las constantes C y K , proveen información acerca de la energía de interacción de las moléculas de agua en la monocapa y la multicapa, respectivamente (Quirijns *et al.*, 2005). En la Tabla 3, se muestra también el contenido de humedad correspondiente al volumen de microporo. Azuara y Beristain (2007) demostraron que en los microporos de matriz polimérica el agua interacciona con los sitios más activos de adsorción, formando una capa protectora contra la oxidación y a la vez, no participando como medio para reacciones de deterioro.

Se observaron diferencias significativas de los parámetros calculados entre los bioplásticos elaborados. Sin

Tabla 3. Parámetros de la ecuación de GAB y DR obtenidos a partir de las isoterms de adsorción de los bioplásticos a 35°C.

Table 3. GAB and DR equation parameters obtained from the bioplastics adsorption isotherms at 35 °C.

Parámetros	C	CM	CJ	CC
M_0	4.63±0.12 b	4.30±0.01 c	5.24±0.11 a	4.52±0.07 b
C	4.64±0.34 b	5.37±0.67 a	3.20±.22 d	3.97±.24 c
K	0.88±0.02 a	0.89±0.02 a	0.81±0.01 b	0.88±0.02 a
n_0	5.05±0.03 a	4.98±0.12 ab	4.59±0.17 b	4.62±0.34 b
r^2	0.99	0.99	0.99	0.99

Control (C), cáscara de mango (CM), cálices de jamaica cocidos (CJ), residuos de café tostado (CC). Letras distintas en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

embargo, a pesar de las diferencias, la a_w correspondiente a la monocapa de GAB y al volumen de microporo fue cercana a 0.4. La a_w correspondiente a la monocapa de GAB para C, CM, CJ y CC fue de 0.36 (4.64 g agua/100 g sólido seco), 0.34 (4.30 g agua/100 g sólido seco), 0.44 (5.24 g agua/100 g sólido seco) y 0.38 (4.54 g agua/100 g sólido seco), respectivamente. En el mismo sentido, la a_w correspondiente al volumen de microporo para C, CM, CJ y CC fue de 0.39 (5.05 g agua/100 g sólido seco), 0.39 (4.98 g agua/100 g sólido seco), 0.38 (4.59 g agua/100 g sólido seco) y 0.38 (4.62 g agua/100 g sólido seco), respectivamente. Por lo tanto, se puede concluir que las condiciones óptimas de almacenamiento de los bioplásticos obtenidos a 35°C, independientemente del subproducto agregado, es a una $a_w < 0.4$. En esta a_w , el agua adsorbida no participará en reacciones de deterioro.

Evaluación de las transiciones térmicas

Los termogramas (Figura 4) muestran los cambios en la capacidad calorífica de los bioplásticos. Se encontró que C, CM, CJ y CC exhibieron un evento endotérmico a una temperatura de 179°C, 178°C, 178°C y 172°C, respectivamente, asociado a un proceso de fusión de las cucharas. En esta fase el material experimenta una transición de fase de sólido a líquido, lo que conlleva al ablandamiento del biopolímero (Worgull, 2009).

A temperaturas más elevadas, se observó un evento de oxidación en C, CJ y CC a una temperatura de 296°C,

mientras que en CM se presentó a 298°C. La oxidación de las muestras se corresponde con un reordenamiento molecular y se observa como un fuerte aumento en el flujo de energía debido a la naturaleza exotérmica de las reacciones de oxidación. Este proceso se explica por el hecho de que la exposición prolongada de un material polimérico a una temperatura elevada propicia la escisión de las cadenas permitiendo al oxígeno atmosférico difundir a través de la superficie y reaccionar con la estructura del biopolímero (Kuakpetoon y Wang, 2008). Como consecuencia el almidón y la gelatina presentan una reorganización estructural; la oxidación introduce grupos carbonilo y carboxilo en las cadenas de carbonadas, dando lugar a un proceso inicial de degradación térmica. Estos resultados son congruentes con Beninca *et al.* (2008), quienes señalan que el tratamiento térmico del almidón conduce normalmente a su degradación cuando la temperatura aplicada supera los 300°C. Un aumento adicional de la temperatura produce la carbonización del material polimérico, en donde las cadenas moleculares son destruidas por la energía térmica (Worgull, 2009).

A pesar de que se ha reportado que específicamente la adición de fibra a la matriz de almidón tiene un efecto favorecedor sobre la estabilidad térmica del biopolímero, aumentando la temperatura de degradación y disminuyendo la pérdida de masa (Xu y Hanna, 2009), en este estudio se observó que los eventos térmicos de todas las formulaciones fueron similares, por lo tanto, se puede establecer que

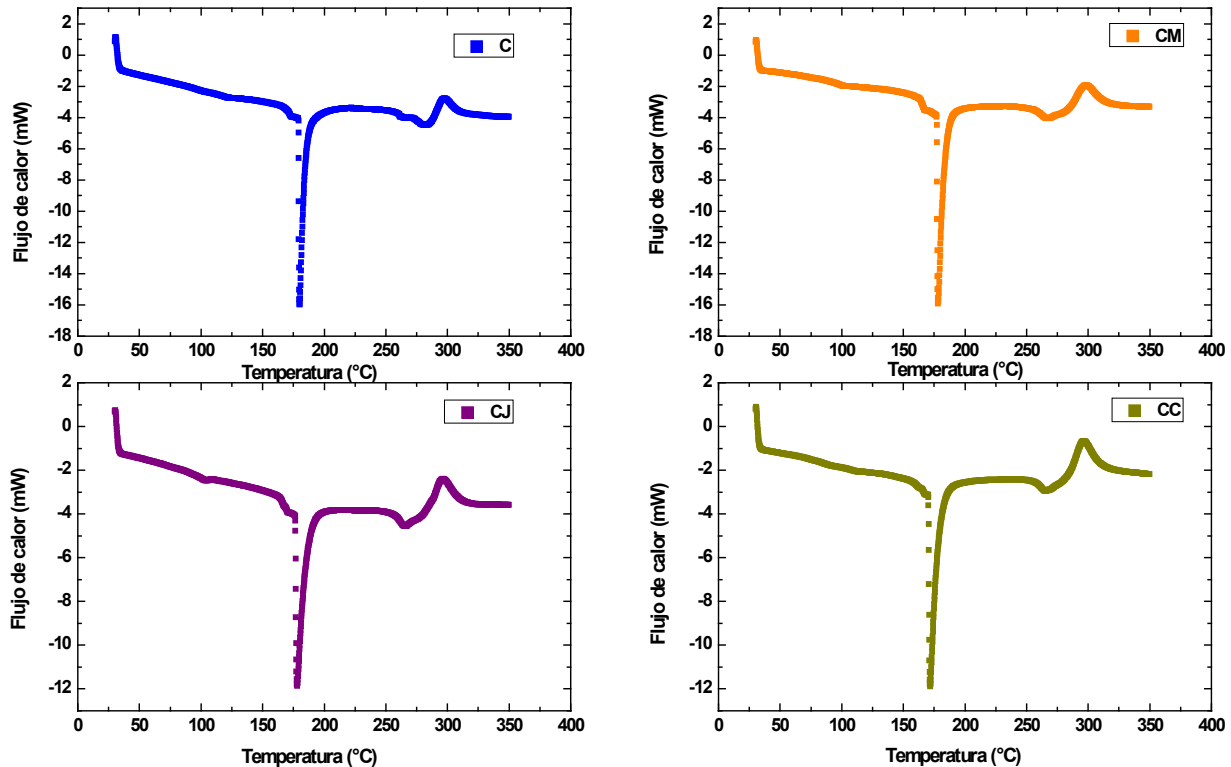


Figura 4. Termogramas DSC de los bioplásticos. Control (C), cáscara de mango (CM), cálices de jamaica cocidos (CJ), residuos de café tostado (CC).

Figure 4. Bioplastics DSC thermograms. Control (C) mango peel (CM), decocted roselle calyces (CJ), spent coffee grounds (CC).

la adición de los subproductos agroindustriales a la matriz polimérica no afectó la estabilidad al calor de las cucharas. Este resultado también fue reportado por De Carvalho *et al.* (2018) al no observar cambios en las transiciones térmicas de películas de almidón adicionadas con fibras de bagazo de yuca. Los eventos térmicos de los biopolímeros fueron en general bastante uniformes, indicando una buena interacción entre los componentes glicerol, grenetina, almidón y fibras, por lo que no influyen en el mecanismo de descomposición de los bioplásticos, siendo esto favorable para la sustitución parcial de almidón y gelatina por subproductos sin un valor económico en la elaboración de estos.

Biodegradación de los polímeros

En la Figura 5 se muestra el aspecto físico de los biopolímeros a las 0, 48 y 120 horas de su entierro en suelo con una HR=100%. Durante el tiempo analizado, se observó un cambio de forma y un deterioro visual del color y de las propiedades mecánicas de los bioplásticos elaborados. A las 48 h del ensayo, independientemente del subproducto utilizado para la elaboración del bioplástico, se visualizó una notable pérdida de rigidez, dada por el agua absorbida del medio, la cual interacciona a nivel molecular con los componentes del biopolímero, favoreciendo su degradación (Hoover, 2001). La degradación de los biopolímeros que puede atribuirse a su composición. Diversos autores señalan que el proceso de desintegración se favorece en bioplásticos de almidón debido a que son fácilmente hidrolizados por amilasas y

esterasas (Imam *et al.*, 2000; Wang y Zhang, 2009). Después de 120 h, independientemente del subproducto utilizado, la manipulación e identificación de los bioplásticos no fue posible debido a su fragmentación, hinchazón y pegajosidad. El tiempo de degradación observado en este estudio (5 días) fue menor al reportado por López-Velázquez *et al.* (2019) para hidrogeles de gelatina, quitosano, alcohol de polivinilo e inulina (28 días).

Estudios han reportado que la adición fibras naturales influye positivamente en la tasa de biodegradación debido a que actúan como canales que facilitan la entrada microbiana en la matriz polimérica. Franco *et al.* (2004) encontraron que la adición de fibras de agave en bioplásticos de almidón-policaprolactona favoreció el ataque microbiano y la eliminación del almidón a través de la hidrólisis. Imam *et al.* (2005) observaron que la mezcla de almidón y la fibra de cascara de naranja con alcohol de polivinilo se degradaron en 30 días, mientras que la mezcla de almidón y alcohol de polivinilo en 120 días.

CONCLUSIONES

Este estudio exploró exitosamente el potencial de la adición de subproductos de mango, jamaica y café en la elaboración de un bioplástico de almidón-grenetina para elaborar cucharas biodegradables. La caracterización reveló que la adición de los subproductos agroindustriales modificó la capacidad de solubilización y aumentó la absorción de agua, así como la fuerza de fractura de los biopolímeros. Las condiciones óptimas de almacenamiento para los plásticos biodegradables fueron a actividades de agua inferiores a 0.4. Los bioplásticos exhibieron una adecuada estabilidad al calor (hasta 170 °C) y la adición de los subproductos no modificó las propiedades térmicas, siendo esto favorable para la sustitución parcial de almidón y gelatina por subproductos en la elaboración de estos. Los bioplásticos demostraron ser biodegradables en suelo. Por lo tanto, los subproductos de mango, jamaica y café, que actualmente no tienen un valor comercial, representan una fuente potencial de fibra que puede incorporarse a bioplásticos de almidón y gelatina para la obtención de cucharas biodegradables.

REFERENCIAS

- Abarca, D., Martínez, R., Muñoz, J., Torres, M., y Vargas, G., 2010. Residuos de Café, Cacao y Cladodio de Tuna: Fuentes Promisorias de Fibra Dietaria. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 23(2):63-69.
- Al-Muhtaseb, A., Mcminn, W., y Magee, T. 2004. Water sorption isotherm of starch powders Part 1: Mathematical description of experimental data. *Journal of Food Engineering*, 61(3):297-307.
- Aranda, F. J., González, R., Jasso, C. F., y Mendizábal, E. 2015. Water absorption and thermomechanical characterization of extruded starch/poly (lactic acid)/agave bagasse fiber bioplastic composites. *International Journal of Polymer Science*, 2015: 1-7.
- Ashori, A., y Nourbakhsh, A. 2010. Bio-based composites from waste agricultural residues. *Waste Management*, 30(4): 680-684.

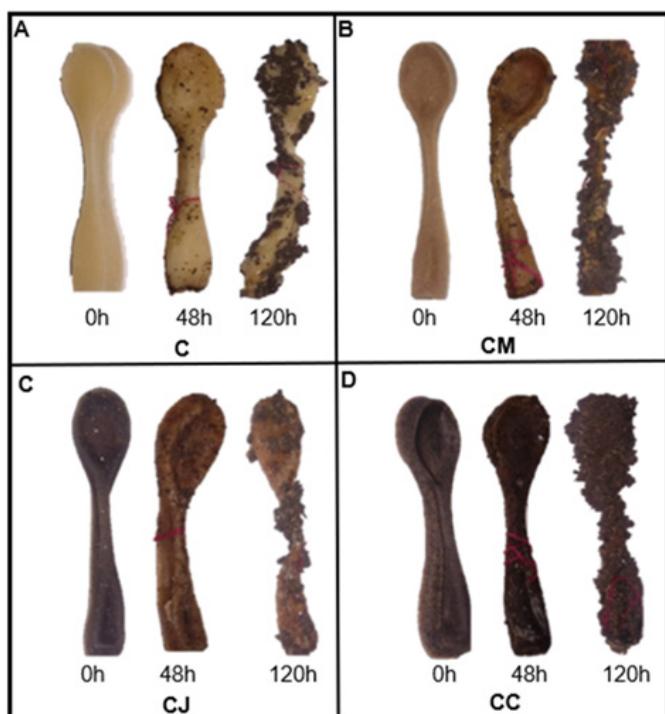


Figura 5. Prueba de degradación en suelo de los bioplásticos. A) Control (C); B) cáscara de mango (CM); C) cálices de jamaica cocidos (CJ); D) residuos de café tostado (CC).

Figure 5. Bioplastics soil burial test . A) Control (C); B) mango peel (CM); C) decocted roselle calyces (CJ); D) spent coffee grounds (CC).

- ASTM. 2005. Standard test method for plastics. In: Annual Book of ASTM Standards. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.
- Avérous, L. y Boquillon, N. 2004. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviors. *Carbohydrate Polymer*. 56:111-122.
- Azuara-Nieto, E., y Beristain-Guevara, C. I. (2007). Estudio termodinámico y cinético de la adsorción de agua en proteína de suero de leche. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(3), 359-365.
- Beninca, C., Demiate, I. M., Lacerda, L. G., Carvalho Filho, M. A. D. S., Ionashiro, M., y Schnitzler, E. 2008. Thermal behavior of corn starch granules modified by acid treatment at 30 and 50 C. *Eclética Química*, 33(3), 13-18.
- Bertuzzi, M. A., Armada, M., y Gottifredi, J. C. 2007. Physicochemical characterization of starch-based films. *Journal of Food Engineering*, 82(1): 17-25.
- Brizga, J., Hubacek, K., y Feng, K. (2020). The Unintended Side Effects of Bioplastics: Carbon, Land, and Water Footprints. *One Earth*, 3(1), 45-53.
- Brunauer, S., Deming, L. S., Deming, W. E., y Teller, E. 1940. On a theory of the van der Waals adsorption of gases. *Journal of the American Chemical Society*, 62(7), 1723-1732.
- Curvelo, A., De Carvalho, A., Agnelli, J. 2001. Thermoplastic starch-cellulosic fibers composites: Preliminary results. *Carbohydrate Polymers*. 45:183-188.
- De Carvalho, G. R., Marques, G. S., de Matos Jorge, L. M., y Jorge, R. M. M. (2018). Cassava bagasse as a reinforcement agent in the polymeric blend of biodegradable films. *Journal of Applied Polymer Science*, 47224.
- Franco, C., Cyras, V., Busalmen, J., Ruseckaite, R. y Vázquez, A. 2004. Degradation of polycaprolactone/starch blends and composites with sisal fibre. *Polymer Degradation and Stability*, 86:95-103.
- García-Gurrola, A., Rincón, S., Escobar-Puentes, A. A., Zepeda, A., y Martínez-Bustos, F. 2019. Microencapsulation of red sorghum phenolic compounds with esterified sorghum starch as encapsulant materials by spray drying. *Food Technology and Biotechnology*, 57(3), 341.
- Gáspar, M., Benkó, Z., Dogossy, G., Réczey, K., y Czigány, T. 2005. Reducing water absorption in compostable starch-based plastics. *Polymer Degradation and Stability*. 90:563-569.
- Gounavé, F., Marais, S., Bessadok, A., Lan Gevin, D., Morvan, C., y Métayer, M. 2006. Study of water sorption in modified flax fibers. *Journal of Applied Polymer Science*. 101:4281-4289.
- Hoover, R. 2001. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydrate Polymer*. 45:253-267.
- Imam, S. H., Cinelli, P., Gordon, S. H., y Chiellini, E. 2005. Characterization of biodegradable composite films prepared from blends of poly (vinyl alcohol), cornstarch, and lignocellulosic fiber. *Journal of Polymers and the Environment*. 13(1):47-55.
- Imam, S., Gordon, S., Shogren, R., Tosteson, T., Govind, N. y Greene, R. 2000. Degradation of starch-poly(b-hydroxybutyrate-co-b-hydroxvalerate) bioplastic in tropical coastal waters. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:431-437.
- Jumaidin, R., Khiruddin, M. A. A., Saidi, Z. A. S., Salit, M. S., y Ilyas, R. A. (2020). Effect of cogon grass fibre on the thermal, mechanical and biodegradation properties of thermoplastic cassava starch biocomposite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 146, 746-755.
- Kaisangsri, N., Kerdchoechuen, O., y Laohakunjit, N. (2014). Characterization of cassava starch based foam blended with plant proteins, kraft fiber, and palm oil. *Carbohydrate Polymers*, 110, 70-77.
- Krishnamurthy, A., y Amritkumar, P. (2019). Synthesis and characterization of eco-friendly bioplastic from low-cost plant resources. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1432.
- Kuakpetoon, D., y Wang, Y. 2008. Locations of hypochlorite oxidation in corn starches varying in amylose content. *Carbohydrate Research*. 343:90-100.
- López-Velázquez, J. C., Rodríguez-Rodríguez, R., Espinosa-Andrews, H., Qui-Zapata, J. A., García-Morales, S., Navarro-López, D. E., y Luna-Barcéas, G., Vassallo-Brigneti, E. T. y García-Carvajal, Z. Y. (2019). Gelatin-chitosan-PVA hydrogels and their application in agriculture. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(11), 3495-3504.
- Lubis, M., Gana, A., Maysarah, S., Ginting, M. H. S., y Harahap, M. B. 2018. Production of bioplastic from jackfruit seed starch (*Artocarpus heterophyllus*) reinforced with microcrystalline cellulose from cocoa pod husk (*Theobroma cacao L.*) using glycerol as plasticizer. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 309:012100.
- Lucas, N., Bienaime, C. and Belloy, C. 2008. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review, *Chemosphere*. 73(4):429-442.
- McNutt, J. (2019). Spent coffee grounds: A review on current utilization. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 71, 78-88.
- Maldonado, Y., Jiménez, J., Arámbula, G., Flores, V., Álvarez, P., Ramírez, M., y Salazar, R. 2019. Effect of water activity on extractable polyphenols and some physical properties of *Hibiscus sabdariffa L.* calyces. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 13(1):687-696.
- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N., y Zaritzky, N. E. (2002). Microstructural characterization of yam starch films. *Carbohydrate Polymers*, 50(4), 379-386.
- Mayo-Mayo, G., Navarrete-García, A., Maldonado-Astudillo, Y. I., Jiménez-Hernández, J., Santiago-Ramos, D., Arámbula-Villa, G., Álvarez-Fitz, P., Ramírez, M. y Salazar, R. (2020). Addition of roselle and mango peel powder in tortilla chips: a strategy for increasing their functionality. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 1511-1519.
- Navia, D., Ayala, A. y Villada, H. 2011. Adsorption isotherms of cassava flour bioplastics compression molded. *Bioteecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 9(1):77-87.
- Moro, T. M., Ascheri, J. L., Ortiz, J. A., Carvalho, C. W., y Meléndez-Arévalo, A. (2017). Bioplastics of native starches reinforced with passion fruit peel. *Food and Bioprocess Technology*, 10(10), 1798-1808.
- Peng, G., Chen, X., Wu, W., y Jiang, X. 2007. Modeling of water sorption isotherm for corn starch. *Journal of Food Engineering*, 80(2):562-567.
- Quirijns, E. J., van Boxtel, A. J., van Loon, W. K., y van Straten, G. 2005. Sorption isotherms, GAB parameters and isosteric heat of sorption. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(11):1805-1814.
- Rodríguez, W., Flores, J., Martínez, F., Chinas, F., Espinoza, F. 2014. Nanomechanical properties and thermal stability of recycled cellulose reinforced starch-gelatin polymer composite. *The Journal of Applied Polymer Science*. 132(4).

- Santillán-Moreno, A., Martínez-Bustos, F., Castaño-Tostado, E., y Amaya-Llano, S. L. (2011). Physicochemical characterization of extruded blends of corn starch–whey protein concentrate–Agave tequilana fiber. *Food and Bioprocess Technology*, 4(5), 797-808.
- Syamani, F. A., Pramasari, D. J., Kusumaningrum, W. B., Kusumah, S. S., Masruchin, N., Ermawati, R., y Cahyaningtyas, A. A. (2020). Characteristics of Bioplastic Made from Cassava Starch Filled with Fibers from Oil Palm Trunk at Various Amount. *E&ES*, 439(1), 012035.
- Torres, F. G., Mayorga, J. P., Vilca, C., Arroyo, J., Castro, P., y Rodríguez, L. (2019). Preparation and characterization of a novel starch–chestnut husk biocomposite. *SN Applied Sciences*, 1(10), 1158.
- Väisänen, T., Haapala, A., Lappalainen, R., y Tomppo, L. 2016. Utilization of agricultural and forest industry waste and residues in natural fiber-polymer composites: A review. *Waste Management*. 54:62-73.
- Velásquez, S., Pelaéz, G., Giraldo, D. 2016. Use of vegetable fibers in polymer matrix composites: a review with a view to their application in designing new products. *Informador Técnico (Colombia)*. 80(1):77-86.
- Williamson, K., y Hatzakis, E. (2019). NMR analysis of roasted coffee lipids and development of a spent ground coffee application for the production of bioplastic precursors. *Food Research International*, 119, 683-692.
- Worgull, M. 2009. Molding Materials for Hot Embossing. En: *Hot Embossing: Theory and Technology of Microreplication*. William Andrew (ed.), pp 57-112, Oxford, UK.
- Xu, Y. y Hanna, M. 2005. Preparation and properties of biodegradable foams from starch acetate and poly(tetramethylene adipate-co-terephthalate). *Carbohydrate Polymer*. 59:521-529.
- Yang, J., Ching, Y. C., y Chuah, C. H. (2019). Applications of lignocellulosic fibers and lignin in bioplastics: A review. *Polymers*, 11(5), 751.
- Wang, Y., y Zhang, L. (2009). In L. Yu (Ed.), *Biodegradable polymer blends and composites from renewable resources* (pp. 129-161). New Jersey: Wiley. Part I, Chapter 6.
- Wang, W., Wang, H., Jin, X., Wang, H., Lin, T., y Zhu, Z. (2018). Effects of hydrogen bonding on starch granule dissolution, spinnability of starch solution, and properties of electrospun starch fibers. *Polymer*, 153, 643-652.

Cocción tradicional con especias de *Phaseolus vulgaris* L. y su efecto antinutricional e inhibición bacteriana

Traditional cooking with spices from *Phaseolus vulgaris* L. and its antinutritional effect and bacterial inhibition

Alexis Lamz Piedra¹, Zulema Cázares Chávez², José Cruz Jiménez Galindo³, Francisco Javier Molina Corral⁴, David Roberto Sepúlveda Ahumada⁴, Claudio Rios-Velasco⁴, Guadalupe Isela Olivas Orozco^{4*}

¹ Departamento de Genética y Mejoramiento de las Plantas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba

² Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Circuito Universitario Campus II. CP 31125, Chihuahua, Chih., México

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Av. Hidalgo 1213, Col. Centro, Cd. Cuauhtémoc, Chih., México

⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Av. Rio Conchos S/N, CP 31570, Cuauhtémoc, Chih., México.

RESUMEN

El frijol ha sido un alimento importante para los mexicanos desde tiempos ancestrales. En el pasado, los frijoles eran cocinados en ollas de barro agregando especias (epazote o laurel). En la actualidad, las ollas de presión han remplazado a las de barro y el uso de especias es casi una tradición perdida. Para comprender los métodos tradicionales de cocción, el presente trabajo evaluó el efecto de la adición de especias (laurel o epazote) y del método de cocción (olla de barro o de presión), sobre las características antinutricionales y la inhibición bacteriana. Los resultados muestran que los métodos tradicionales, olla de barro, adición de epazote y laurel, así como el remojo, disminuyen considerablemente la concentración de α -oligosacáridos. Mientras que la cocción en olla de presión con previo remojo, disminuye en mayor proporción la concentración de ácido fítico y reduce la actividad de los compuestos inhibidores de tripsina. Por otro lado, el uso de especias inhibe el crecimiento microbiano. Una combinación de cocina tradicional mexicana (remojo y uso de especias) y cocina moderna (olla a presión) disminuye los compuestos antinutricionales y conserva la calidad microbiana de los frijoles. Estos resultados muestran la importancia de estudiar y preservar la cocina tradicional mexicana.

Palabras clave: Frijol, oligosacáridos, ácido fítico, laurel, epazote

ABSTRACT

Beans have been an essential food for Mexicans since ancient times. In the past, beans were cooked in clay pots with spices (epazote or bay leaf) added. Today, pressure cookers have replaced clay cookers, and herbs are almost a lost tradition. To understand traditional cooking methods, the present work evaluated the effect of the addition of spices (laurel or epazote) and the cooking method (clay pot or pressure cooker), on antinutritional characteristics and bacterial inhibition. The results show that the traditional techniques, clay pot, spices addition (epazote and bay leaf), and soaking, considerably decrease the concentration of

α -oligosaccharides. On the other hand, when cooking in a pressure cooker with previous soaking, the concentration of phytic acid decreases to a greater extent, and reduces the activity of trypsin inhibitor compounds. On the other hand, the use of spices inhibits microbial growth. A combination of traditional Mexican cuisine (soaking and herbs usage) and modern cuisine (pressure cooker) decreases antinutritional compounds and preserves the beans' microbial quality. These results show the importance of studying and maintaining traditional Mexican cuisine.

Keywords: Beans, phytic acid, oligosaccharides, bay leaf, epazote

INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) forma parte importante de la dieta del ser humano en muchos países del mundo, especialmente en África, India y Centroamérica (Xu y Chang, 2009; Chávez-Mendoza et al., 2019). En México, los frijoles han sido importantes constituyentes de la dieta, por su valor nutricional que incluye altos niveles de proteína, fibra dietética, almidón resistente, ácido α -linolénico y micronutrientes como: hierro, zinc, entre otros (Hayat et al., 2014; Lo Turco et al., 2016; Gomes Basso Los et al., 2018; Corzo-Ríos et al., 2020). Además, los frijoles contienen compuestos bioactivos con propiedades benéficas para la salud, entre estos: ácidos fenólicos, flavonoles, isoflavonas, taninos, antocianinas y procianidinas (Chávez-Mendoza et al., 2019; Parmar et al., 2017; Xu y Chang, 2009). En años recientes se ha encontrado evidencia del efecto positivo del consumo de esta leguminosa en la prevención de enfermedades y en la promoción de la salud; y se le ha considerado un tratamiento efectivo para la prevención y control de obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares y cáncer (Ulloa et al., 2011; Hayat et al., 2014; Gomes Basso Los et al., 2018; Pérez-Ramírez et al., 2018; Armendáriz-Fernández et al., 2019).

Sin embargo, los frijoles contienen algunos constituyentes antinutricionales, tales como: los compuestos inhibidores de tripsina y los fitatos, los cuales pueden reducir la biodisponibilidad de nutrientes, además de los α -galacto-

*Autor para correspondencia: Guadalupe Isela Olivas Orozco

Correo electrónico: golivas@ciad.mx

Recibido: 21 de julio de 2020

Aceptado: 11 de octubre de 2020

oligosacáridos, causantes de inflamación abdominal y flatulencias. Los inhibidores de tripsina son proteínas de bajo peso molecular capaces de ligar la tripsina, enzima peptidasa digestiva, impidiendo la hidrólisis de proteínas y la absorción de aminoácidos (Wang et al., 2010). Los fitatos reducen la biodisponibilidad de minerales esenciales al funcionar como quelantes de metales catiónicos como el zinc, el hierro, el calcio y el magnesio (Parmar et al., 2017). La remoción de estos componentes mejora la calidad nutricional del frijol (Machaiyah y Pednekar, 2002). Una de las principales causas disuasorias para el consumo de frijol son los α -galactoligosacáridos (Aguilera et al., 2009). Debido a la ausencia de la enzima α -galactosidasa en el organismo humano, estos compuestos no son hidrolizados en la parte superior del tracto gastrointestinal, siendo posteriormente fermentados por la microbiota del colon, con la consecuente producción de gases (dióxido de carbono, hidrógeno y metano) y generación de inflamación y flatulencias (Njoumi et al., 2019).

Para disminuir la concentración de los componentes antinutricionales, es necesario el procesamiento térmico de los frijoles. La cocción es probablemente el tratamiento más antiguo y más utilizado de procesamiento de frijoles (Revilla, 2015). Sin embargo, en México, la manera de cocinar el frijol ha cambiado con el tiempo. En el pasado los frijoles eran cocinados en olla de barro usando especias como epazote (*Chenopodium ambrosioides*), o laurel (*Laurus nobilis*), con la creencia de que estas hierbas disminuían los problemas de flatulencia en los consumidores. En la actualidad, la acelerada transformación de las prácticas alimentarias; expresada por la disminución en el tiempo dedicado a la elaboración y al consumo de los alimentos (Meléndez y Cañez, 2009), ha fomentado el uso de ollas de presión, que disminuyen el tiempo de cocción de los alimentos; dejando a un lado el uso tradicional de las ollas de barro. Igualmente, el uso de especias ha sido prácticamente olvidado como efecto de la globalización, que ha llevado a la pérdida de las raíces culinarias (Leyva y Pérez, 2015); todo esto en menoscabo de nuestras tradiciones ancestrales, sin haber antes estudiado y comprendido la relevancia de lo que se está perdiendo. Por lo anterior el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la cocción del frijol por métodos tradicionales sobre los factores antinutricionales del frijol Pinto Saltillo (*Phaseolus vulgaris*); evaluando la cocción en olla de barro o a presión, el empleo de remojo, así como el uso de hojas de laurel (*Laurus nobilis*) o epazote (*Chenopodium ambrosioides*).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), unidad Cuauhtémoc, Chihuahua, México. Para el estudio se empleó frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de la variedad 'Pinto Saltillo' cultivado en la región de Namiquipa, Chihuahua. Para la realización de todas las determinaciones se utilizó una cantidad de 42 Kg aproximadamente de frijol.

Preparación del frijol

El frijol fue sometido a los siguientes tratamientos: con remojo y sin remojo previo a la cocción, cocción con adición de epazote, laurel o sin especias (control); y cocción en olla de barro o en olla de presión. Para la preparación de los frijoles cocidos se pesaron y lavaron 150 g de frijol por tratamiento. El frijol con remojo se sometió a inmersión en 1000 mL de agua a temperatura ambiente durante 12 horas. El frijol sometido al tratamiento de cocción en olla a presión se cocinó con un litro de agua durante 45 minutos a temperatura de 121°C, y el destinado a tratamiento en olla de barro se cocinó con dos litros de agua durante 3 horas a 96 °C. Antes de la cocción, epazote fresco (0.39 g), laurel seco (0.07 g), o ninguna especia fueron adicionadas. Los frijoles en combinación con el caldo de la cocción fueron enfriados a temperatura ambiente y homogenizados para su posterior análisis.

Determinación del contenido de ácido fítico

El contenido de fitatos se determinó mediante el método reportado por Al-Kaisey et al. (2003). Para el frijol cocido en olla de barro se tomó una muestra de 6 g de frijol y 6 mL de caldo; para el frijol cocido en olla a presión se pesaron 6 g de frijol y 12 mL de caldo (cantidades de agua proporcionales al agua restante después de cocción). La absorbancia fue medida a 830 nm (Espectrofotómetro UV-VIS marca Varian, modelo Cary, Walnut Creek, CA, EUA), para determinar el contenido de fósforo insoluble en la sal férrica. Los valores de absorbancia de las muestras obtenidos en el espectrofotómetro se interpolaron en una curva de calibración construida utilizando ácido fítico como estándar (Sigma-Aldrich), en concentraciones entre 0 y 10 mg/g. El ácido fítico fue calculado asumiendo que contiene 28.2% de fósforo (Al-Kaisey et al., 2003). El contenido de ácido fítico fue expresado en mg/g de materia seca.

Determinación del contenido de oligosacáridos (rafinosa, estaquiosa y verbascosa)

El contenido de oligosacáridos fue determinado por el método de Sánchez-Mata et al. (1998), utilizando una mezcla de 4.5 g de frijol cocido mezclados con 4.5 ml de caldo para el tratamiento de cocción en olla de barro, y 4.5 g de frijol y 9 g de agua para el tratamiento de cocción en olla de presión (cantidades de agua proporcionales al agua restante después del proceso cocción). Las muestras se analizaron por HPLC (Varian, modelo 9012 Q, EUA), utilizando una columna YMC PBMN de 5 μ m, 4.6x250 mm y 120Å (WATERS, PB12S05-2546WT, EUA), con detector de índice de refracción (32 x 10.6 RIU/FS), y acetonitrilo-agua 60:40 como fase móvil con un flujo de 1 mL/min. Los valores obtenidos fueron interpolados en las curvas de calibración, las cuales se realizaron utilizando estándares ultrapuros de rafinosa, estaquiosa y verbascosa (Fluka). El contenido de estos oligosacáridos fue expresado en mg/g de materia seca.

Contenido de inhibidor de tripsina

El contenido de inhibidor de tripsina se determinó colorimétricamente siguiendo el método descrito por Hamerstrand et al. (1981), utilizando un espectrofotómetro (UV-VIS marca Varian, modelo Cary, Walnut Creek, CA, EUA) a 392 nm contra el blanco. La muestra de frijol cocido utilizada para el tratamiento en olla de barro; mientras que para el tratamiento en olla de presión la muestra consistió en una mezcla de 3 g de frijol y 6 mL de caldo de cocción.

Análisis microbiológico

Para evaluar el desarrollo microbiano de la bacteria *Pseudomona alcaligenes* una muestra de frijol cocido de cada tratamiento (150 mL de caldo de cocción y 150 g de frijol cocido) fue homogeneizada con un equipo Stomacher (IUL, modelo 181/520, EUA) durante 90 segundos y posteriormente inoculada con 100 μ L de suspensión bacteriana conteniendo 1×10^9 UFC. El homogeneizado de frijol se almacenó a 4 °C y se muestreó diariamente por un periodo de cinco días para determinar la carga psicotrófica, preparando diluciones seriadas en agua peptonada, las cuales se sembraron en cajas Petri con agar *Pseudomona* y se incubaron a 28 °C durante 24 horas, para realizar el conteo microbiano.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se estableció un diseño experimental factorial con tres repeticiones por tratamiento y tres factores que se definieron en la cocción del frijol (olla a presión y olla de barro), remojo (con y sin remojo) y adición de especias (laurel, epazote y control). Luego de comprobar los supuestos teóricos normalidad y homogeneidad de varianza, los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza factorial y las diferencias significativas entre tratamientos se verificaron por la prueba de rango múltiple de Tukey $p \leq 0.05$ con el paquete estadístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ácido fítico

El análisis de varianza del ácido fítico muestra diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en los factores de remojo, cocción y en la doble interacción de remojo-cocción y especias-cocción. No se observó efecto significativo del uso de especias en la disminución del contenido de ácido fítico y así mismo, no se detectaron diferencias estadísticas en la triple interacción remojo-especias-cocción ($p > 0.05$).

En la Figura 1 se puede apreciar el efecto de los factores y de la interacción entre ellos. Se obtuvieron resultados muy claros, los cuales muestran como la cocción en olla a presión ejerce un mayor efecto en la disminución del ácido fítico. Sin embargo, esta disminución fue más marcada cuando existe un previo remojo (en promedio 4.2 mg/g y 5.7 mg/g, respectivamente). La Figura 1 muestra como la cocción bajo presión por sí sola es capaz de disminuir el contenido de este factor antinutricional siendo esta la forma de preparación del frijol más adoptada en la actualidad en las diferentes comu-

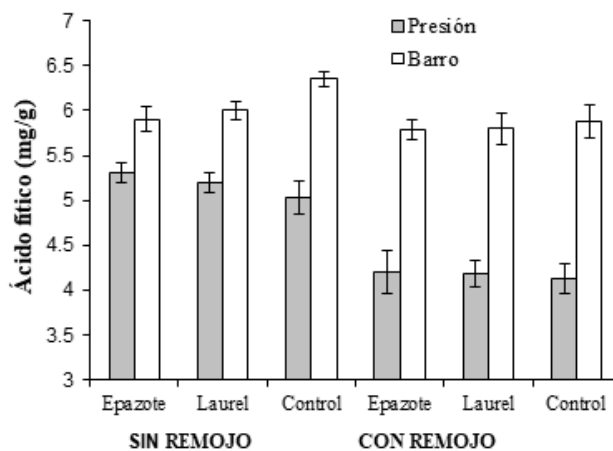


Figura 1. Efecto del remojo, del uso de especias (laurel y epazote) y del método de cocción (olla a presión o de barro) sobre la concentración de ácido fítico en frijol 'Pinto Saltillo' (mg/g base seca). Las barras en las columnas indican la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento para $P < 0.05$.

Figure 1. Effect of soaking, use of spices (bay leaf and epazote), and cooking method (pressure cooker or clay), on the concentration of phytic acid in 'Pinto Saltillo' beans (mg / g dry base). Bars indicate the standard deviation of three repetitions per treatment for $P < 0.05$.

nidades, así como en la industria para la preparación de frijol precocido (Revilla, 2015).

También se pudo apreciar que el contenido de fitatos en la combinación especia-cocción en olla de barro y sin remojo fue significativamente menor ($p \leq 0.05$); es decir, cuando el frijol es cocido en olla de barro sin remojo el uso de estas especias disminuiría la concentración de este antinutriente (Figura 1), lo que realza el valor de estas especias que tradicionalmente han sido empleadas por los pobladores de México pudiendo mejorar la disponibilidad de minerales importantes en la nutrición humana.

Aunque no se han detallado los posibles cambios provocados por el uso de la presión en la cocción de leguminosas, varios autores concuerdan en el efecto beneficioso de este método en la disminución del contenido de ácido fítico y otros factores antinutricionales durante la preparación de leguminosas de forma general, posiblemente, se atribuya a cambios en la estructura química de estos compuestos. De acuerdo con Carter y Manthey (2019) la cocción promueve cambios estructurales en la superficie de la cubierta de semillas y el interior de estas. Al respecto, Rehman y Shah (2005) informaron que al incrementar la temperatura en cocción a presión hasta 121°C por 90 minutos y a 128°C por 20 minutos el contenido de ácido fítico disminuye de 28.0 – 51.6% respecto a la cocción ordinaria. Las investigaciones de Kon (1979), refieren que con la cocción a presión se ejerce un mayor rompimiento de algunas células del frijol donde se incluyen los nutrientes y antinutrientes, los cuales se liberan al medio de cocción y consecuentemente se produce una reducción de ácido fítico en la leguminosa. Lo anterior concuerda con las afirmaciones de Grewal y Jood (2006) que atribuyen a este fenómeno a la destrucción de éste factor antinutricional por el tratamiento térmico.

El remojo disminuyó considerablemente la concentración de ácido fítico en el frijol (Figura 1). Alonso et al. (2000), reportan una reducción significativa en la concentración de ácido fítico después de someter el frijol a un remojo por 12 horas. La reducción en ácido fítico por el remojo ha sido explicada por diferentes investigadores que afirman es el resultado de un efecto de drenaje durante la hidratación (Beleia et al., 1993). Lo anterior concuerda con Grewal y Jood (2006) quienes refieren que la pérdida de ácido fítico en las semillas remojadas se debe a la lixiviación de los iones de fitato dentro del agua por la influencia de la concentración de gradiente (diferencia en el potencial químico) lo cual gobierna la velocidad de difusión. Otras investigaciones concuerdan en que la pérdida de ácido fítico podría también atribuirse a la difusión del agua de remojo a la semilla de frijol lo que podría causar un incremento en la actividad de las fitasas presentes en las leguminosas (Udensi et al., 2007) ya que, de acuerdo con Eskin y Wibe (1983) hay un aumento en la actividad de las fitasas al disminuir el nivel de fitatos como resultado de la hidratación en frijol faba.

Los resultados antes planteados indican que la cocción en barro puede limitar, en mayor medida la disponibilidad de minerales importantes para la nutrición humana, como Ca, Fe, Mg y Zn; por un mayor contenido de ácido fítico en cada porción de frijol consumido, ya que cuando un mineral se une al ácido fítico se vuelve insoluble, precipita y no se absorberá en el intestino, contribuyendo a desarrollar deficiencias de minerales en las personas que utilizan la olla de barro para la cocción de frijol. Esto puede ser un importante problema para las poblaciones de países en vía al desarrollo, sobre todo en los países del continente americano y en África donde el frijol es un alimento básico y constituye una fuente importante de proteínas y minerales (Escalante-Estrada et al., 2014).

Oligosacáridos

Rafinosa, estaquiosa y verbascosa son los α -galacto-oligosacáridos encontrados comúnmente en las leguminosas (Gomes Basso Los et al., 2018). En el presente trabajo, el frijol 'Pinto Saltillo' solo presentó rafinosa y estaquiosa; no detectándose verbascosa. Estos resultados concuerdan con Pérez-Ramírez et al. (2018) quienes no obtuvieron verbascosa en frijol de esta misma variedad.

Los factores remojo, especia y cocción de frijol afectaron significativamente la concentración de los oligosacáridos rafinosa y estaquiosa ($p \leq 0.05$). En la Figura 2 se puede observar claramente el efecto positivo de todos los factores sobre la disminución de los α -galacto-oligosacáridos, siendo el remojo el factor que disminuyó en mayor proporción el contenido de ambos compuestos (Figura 2), lo que concuerda con Shimelis y Rakshit (2007) en frijol común y con Talari et al. (2018) y Jood et al. (1985) quienes encontraron que el contenido de los oligosacáridos tanto rafinosa como estaquiosa en diferentes leguminosas se reduce altamente cuando son remojadas, de manera proporcional al tiempo de remojo. Favorablemente, el carácter soluble en agua de

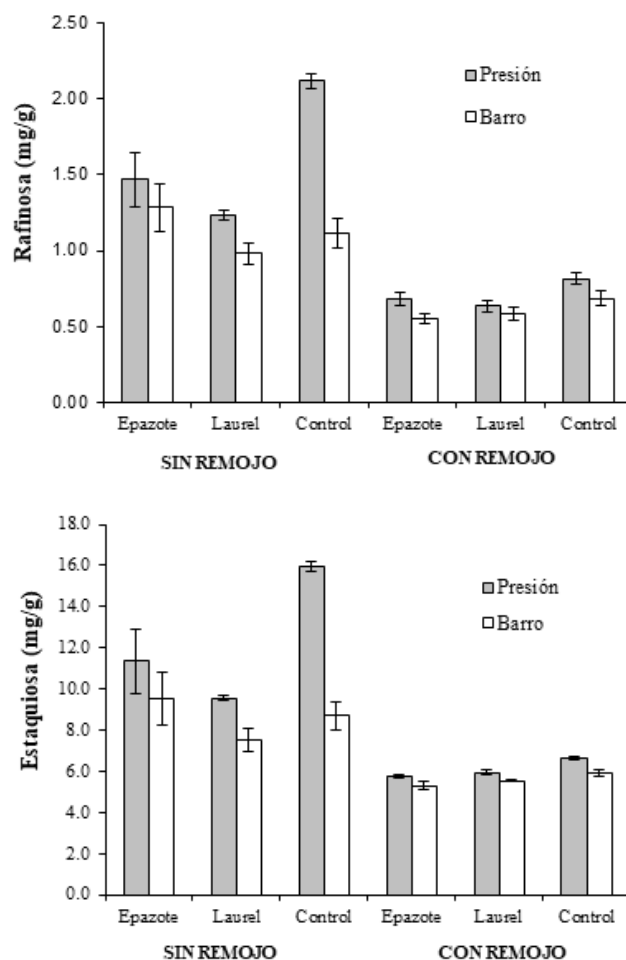


Figura 2. Efecto del remojo, uso de especias (laurel y epazote) y método de cocción (olla a presión o de barro), en la concentración de α -galacto-oligosacáridos rafinosa (A) y estaquiosa (B) en frijol 'Pinto Saltillo' (mg/g base seca). Las barras en las columnas indican la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento para $P < 0.05$.

Figure 2. Effect of soaking, use of spices (bay leaf and epazote), and cooking method (pressure cooker or clay), on the concentration of α -galacto-oligosaccharides raffinose and stachyose in 'Pinto Saltillo' beans (mg/g dry base). Bars indicate the standard deviation of three repetitions per treatment for $P < 0.05$.

los oligosacáridos hace que sea posible su eliminación a través del remojo de las leguminosas (Serna-Cock et al., 2019; Njoumi et al., 2019) por lo tanto, la práctica de remojo antes de la cocción, en sus diferentes variantes, no solo ayuda a la cocción más rápida de sus granos sino que también mejora sus cualidades nutricionales a través de la disminución del contenido de oligosacáridos rafinosa y estaquiosa.

En aquellos tratamientos sin remojo, el efecto tanto del método de cocción como del uso de especias fue considerablemente significativo en la disminución de oligosacáridos ($P < 0.05$). Sin previo remojo, el frijol cocido en olla de barro mostró una considerable reducción en la concentración de rafinosa y estaquiosa, en comparación con la cocción en olla a presión; sugiriendo que un tiempo prolongado de cocción disminuye la concentración de estos oligosacáridos (Figura 2). Esto concuerda con lo reportado por Iyer et al. (1980) quienes

encontraron una menor concentración de oligosacáridos en frijoles sometidos a cocción por 90 min en comparación con una cocción por 15 min. Njoumi et al. (2019) encontraron una considerable disminución de rafinosa y estaquiosa en lentejas, garbanzos y habas, después de un periodo de cocción de 1 h a temperatura de ebullición, atribuyendo este efecto a la activación de enzimas α -galactosidasas inherentes en las leguminosas, las cuales encuentran condiciones óptimas a esta temperatura.

La cocción con presión sin remojo mostró la mayor concentración de α -galacto-oligosacáridos y es aquí donde se puede observar el efecto de las especias, en donde tanto el epazote como el laurel lograron una considerable disminución en la concentración de rafinosa y estaquiosa ($P < 0.05$) (Figura 2). Estos resultados muestran la importancia del uso de especias en la cocción del frijol, cuando este no es sometido a un previo remojo.

La reducción de rafinosa y estaquiosa en frijol mediante la aplicación de las especias (epazote y laurel) (Figura 2), es un resultado científico importante que sustenta la tradición cultural de México, del uso de especias para evitar las flatulencias. Comprobando el criterio de los antepasados mexicanos dada la disminución de esos compuestos que comúnmente están relacionados con la producción de gases a nivel intestinal. Resaltando la importancia de rescatar las tradiciones que se pierden en el tiempo por la adopción de prácticas culinarias que facilitan la preparación de los alimentos pero que pueden disminuir su valor alimenticio.

No existe fundamento hasta el momento, que explique cómo el uso de estas especias disminuye el contenido de rafinosa y estaquiosa, se sugiere la presencia de α -galactosidasas en ambas plantas, epazote y laurel; con una mayor actividad de esta enzima en las hojas de laurel, dado que se observa una mayor disminución de oligosacáridos con el uso de esta especia (Figura 2). Cabe señalar que no se han realizado estudios relacionados con esto, lo cual lleva a seguir supuestos teóricos que podrían significar una importante fuente de futuras investigaciones. Enzimas α -galactosidasas han sido encontradas en hojas de cebada (Chrost et al., 2004; Chrost et al., 2007), en tallos de caña de azúcar (Chinen et al., 1981), en la planta del melón (Chrost y Schmitz, 2000), en hojas de calabacines (Gaudreault y Webb, 1982; Gaudreault y Webb, 1983), así como en hojas de espinaca (Gatt y Baker, 1979).

Inhibidor de tripsina

En cuanto al Inhibidor de tripsina se pudo apreciar que el remojo y la cocción afectaron, significativamente ($P < 0.05$) el contenido de este factor antinutricional lo cual no sucedió con las especias ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las interacciones remojo-cocción, especia-cocción y la triple interacción remojo-especia-cocción mostraron también diferencias estadísticamente significativas.

En el análisis de los factores que mostraron interacción (Figura 3) se pudo apreciar porcentajes de reducción entre 94.52 y 98.82% para los tratamientos cocción en barro

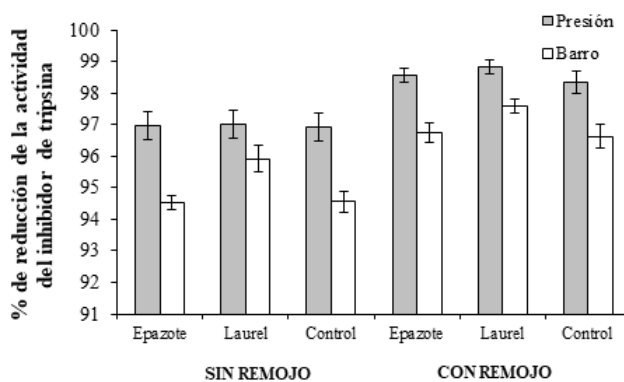


Figura 3. Efecto del remojo, uso de especias (laurel y epazote) y método de cocción (olla a presión o de barro), en la reducción de la actividad del inhibidor de tripsina (%) en frijol 'Pinto Saltillo' (mg/g base seca). Las barras en las columnas indican la desviación estándar de tres repeticiones por tratamiento para $P < 0.05$.

Figure 3. Effect of soaking, use of spices (bay leaf and epazote), and cooking method (pressure cooker or clay), on the reduction of the trypsin inhibitor activity (%) in beans 'Pinto Saltillo'. Bars indicate the standard deviation of three repetitions per treatment for $P < 0.05$.

sin remojo y sin especias y cocción en presión con la especia laurel y con remojo, respectivamente. La cocción en presión por sí sola es capaz de reducir el inhibidor de tripsina en mayor cantidad que la olla de barro, pero la cocción con presión y remojo previo por 12 h es aún más efectiva en la reducción de este factor antinutricional que la presión sin remojo. Corzo-Ríos et al. (2020) encontraron una pérdida del 100% de la actividad de los inhibidores de tripsina, después del tratamiento térmico bajo presión por 45 minutos. De acuerdo con Corzo-Ríos et al. (2020), los inhibidores de tripsina son proteínas termolábiles que se desnaturalizan durante los tratamientos térmicos de cocción del frijol, perdiendo su actividad.

La reducción del inhibidor de tripsina, mediante tratamientos térmicos, ha sido un aspecto ampliamente estudiado debido que estas enzimas disminuyen la actividad de las enzimas proteasa y reducen la digestibilidad de la proteína bruta (PB) y de los aminoácidos (de Coca-Sinova et al., 2008; Valencia et al., 2008) por lo que, mediante estos tratamientos se logran un mayor aprovechamiento de las proteínas que contienen las leguminosas.

Se ha señalado que los tratamientos térmicos y el remojo previo son capaces de reducir este factor antinutricional, en gran medida, en varias especies de leguminosas. La reducción de este factor antinutricional consecuencia de un remojo previo puede deberse a la solubilidad del inhibidor de tripsina que le permite su migración de la semilla al medio de remojo.

Varios autores (Hernández and Escuerdo, 1993; Bilbao et al., 2000) han informado que la cocción y el remojo son capaces de reducir este antinutriente en frijol. Barampama y Simard (1994) encontraron una reducción de 97.78% al remojar los frijoles y utilizar cocción tradicional. Sin embargo, en esta investigación se encontraron mayores porcentajes de

reducción del inhibidor de tripsina cuando se coció el frijol en olla a presión luego de ser remojado por 12 h (98.3% de reducción), al cocer el frijol en presión con la adición de laurel luego del remojo (98.8%) y al cocer el frijol en presión con la especia epazote luego del remojo (98.5%).

Así mismo, Egounlety y Aworh (2003) han informado de la reducción de este antinutriente con remojo y cocción en leguminosas de importancia económica como la soya (*Glycine max* Merr.), Caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) y frijol molido (*Macrotyloma geocarpa* Harms) y en guisante (*Pisum sativum* L.) (Ma et al., 2018), Sin embargo, no existen reportes de la disminución del inhibidor de tripsina comparando la cocción en olla de presión y en olla de barro en frijol común.

Así mismo, hasta la fecha no existen reportes de la reducción del inhibidor de tripsina en frijol común cuando se combinan la cocción con las especias epazote y laurel lo que es relevante dado que se combinan la forma de preparación que más se usa en la actualidad con las especias que tradicionalmente se han empleado en la preparación de este grano.

Crecimiento microbiano

La Figura 4 muestra el efecto del uso de olla de barro versus olla a presión sobre el crecimiento microbiano psicrotrófico durante el almacenamiento de frijoles. Existe un mayor efecto de inhibición microbiana cuando se usa presión en comparación con la olla de barro (Figura 4B). Esto podría deberse al mayor efecto de inhibición microbiana de la alta temperatura de cocción utilizada en la olla a presión (121°C).

El efecto de la inhibición psicrotrófica microbiana debido a la adición de laurel y epazote se muestra en la Figura 4. El día 1, para olla a presión, y los días 1 y 2 para olla de barro, no se observó inhibición microbiana, incluso una inhibición negativa en los frijoles, es decir un incremento en la población bacteriana. Esto podría atribuirse al hecho de que las hojas de laurel y epazote fueron agregadas sin lavado previo y sin sanitización, y es sabido que las especias pueden ser una importante fuente de contaminación microbiana (McKee, 1995). A pesar de esto, posteriormente, se observó una inhibición microbiana psicrotrófica significativa en frijoles que contienen laurel y epazote durante el almacenamiento. Algunos autores han encontrado una alta actividad antifúngica de las hojas de laurel y de epazote (Akdemir Evrendilek, 2015; Erenpreiss et al., 2006; Suhr and Nielsen, 2003).

El uso tradicional de epazote y laurel para cocinar frijoles, y el método de cocción afectaron la calidad microbiana durante el almacenamiento. Los frijoles con epazote y laurel exhibieron inhibición psicrotrófica microbiana, a partir del día 2 de refrigeración (Figura 4). El efecto inhibitorio del laurel fue más pronunciado en el tratamiento de cocción en olla de presión, mientras que el epazote tuvo un mayor efecto inhibitorio cuando el frijol fue sometido a cocción en olla de barro. Los tratamientos a presión mostraron menores cargas microbianas en todo momento durante el almacenamiento en comparación con los tratamientos de barro (Figura 4).

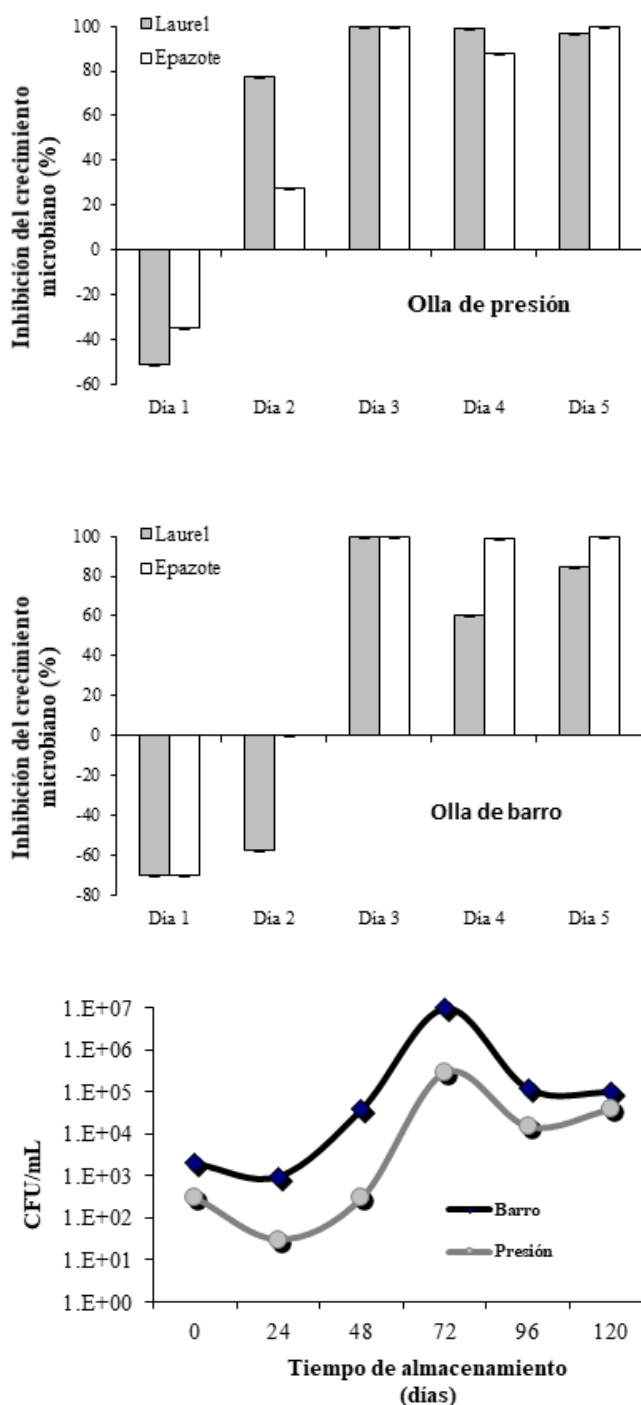


Figura 4. Inhibición del crecimiento de bacterias psicrotróficas, durante el almacenamiento a 4°C durante 5 días, de frijol 'Pinto Saltillo' cocinado en olla a presión o en olla de barro, con la adición de epazote o laurel (A), y sin la adición de especias (B).

Figure 4. Psychrotropic bacteria inhibition during storage at 4 °C for 5 days, of 'Pinto Saltillo' beans cooked in a pressure cooker or a clay pot, with the addition of epazote or bay leaf (A), and without the addition of spices (B).

CONCLUSIONES

Los métodos tradicionales de preparación del frijol empleando laurel y epazote favorecieron la reducción los factores antinutricionales, especialmente los oligosacáridos, así mismo incrementaron la vida de anaquel al inhibir el crecimiento microbiano. Sin embargo, estas especias no tuvieron un efecto significativo en la disminución de ácido fítico. Para una mayor disminución de los factores antinutricionales y una mayor inhibición microbiana la cocción bajo presión con previo remojo y el uso de especias, en especial el laurel, fueron la mejor opción al exhibir mejores resultados. Para el caso de cocción en olla de barro, igualmente se recomienda el remojo previo así como el uso de especias, principalmente epazote. El uso de especias en la cocción del frijol con el objetivo de disminuir el contenido de oligosacáridos causantes de flatulencias, que por tradición, aunque sin fundamento científico, se ha utilizado en México, con el presente trabajo se sustenta. Esto nos lleva a pensar en la importancia de evaluar las tradiciones culinarias mexicanas para evitar que estas se pierdan antes de conocer y sustentar su importancia. Los resultados obtenidos en este estudio muestran la importancia de evaluar el uso de las tradiciones culinarias de México con la finalidad de preservarlas y resaltar su valor.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, Y., Martín-Cabrejas, M. A., Benítez, V., Mollá, E., López-Andréu, F. J. y Esteban, R. M. 2009. Changes in carbohydrate fraction during dehydration process of common legumes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 678-683.
- Akdemir Evrendilek, G. 2015. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 202:35-41.
- Al-Kaisey, M. T., Alwan, A.-K. H., Mohammad, M. H. y Saeed, A. H. 2003. Effect of gamma irradiation on antinutritional factors in broad bean. *Radiation Physics and Chemistry*, 67: 493-496.
- Alonso, R., Aguirre, A. y Marzo, F. 2000. Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*, 68: 159-165.
- Armendáriz-Fernández, K. V., Herrera-Hernández, I. M., Muñoz-Márquez, E. y Sánchez, E. 2019. Characterization of bioactive compounds, mineral content, and antioxidant activity in bean varieties grown with traditional methods in Oaxaca, Mexico. *Antioxidants*, 26: 1-17.
- Barampama, z. y Simard, R. E. 1994. Oligosaccharides, antinutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. *Journal of Food Science*, 59: 833-838.
- Beleia, A., Thu Thao, L. y Ida, E. I. 1993. Lowering phytic phosphorus by hydration of soybeans. *Journal of Food Science*, 58: 375-377.
- Bilbao, T., Hampe, S., Smith, R., Puerta, F. y Ledesma, L. 2000. Presence of antinutritional factors and natural toxins in coloured beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and peas (*Pisum sativum* L.) during storage at room temperature. *Alimentaria*, 37: 147-150.
- Carter, C. E. y Manthey, F. A. 2019. Seed treatments affect milling properties and flour quality of black beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Cereal Chemistry*, 96: 689-697.
- Chávez-Mendoza, C., Hernández-Figueroa, K. y Sánchez, E. 2019. Antioxidant Capacity and Phytonutrient Content in the Seed Coat and Cotyledon of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Various Regions in Mexico. *Antioxidants*, 8: 1-19.
- Chinen, I., Nakamura, T. y Fukuda, N. 1981. Purification and properties of α -galactosidase from immature stalks of *Saccharum officinarum* (sugar cane). *The Journal of Biochemistry*, 90: 1453-1461.
- Chrost, B., Daniel, A. y Krupinska, K. 2004. Regulation of α -galactosidase gene expression in primary foliage leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) during dark-induced senescence. *Planta*, 218: 886-889.
- Chrost, B., Kolukisaoglu, U., Schulz, B. y Krupinska, K. 2007. An α -galactosidase with an essential function during leaf development. *Planta*, 225: 311-320.
- Corzo-Ríos, L. J., Sánchez-Chino, X. M., Cardador-Martínez, A., Martínez-Herrera, J. y Jiménez-Martínez, C. 2020. Effect of cooking on nutritional and non-nutritional compounds in two species of *Phaseolus* (*P. vulgaris* and *P. coccineus*) cultivated in Mexico. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 20: 1-7.
- De Coca-Sinova, A., Valencia, D., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R. y Mateos, G. G. 2008. Apparent ileal digestibility of energy, nitrogen, and amino acids of soybean meals of different origin in broilers. *Poultry Science*, 87: 2613-2623.
- Egounlety, M. y Aworh, O. C. 2003. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms). *Journal of Food Engineering*, 56: 249-254.
- Erenpreiss, J., Spano, M., Erenpreisa, J., Bungum, M. y Giwercman, A. 2006. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*, 8: 11-29.
- Escalante-Estrada, J. A. S., Rodríguez-González, M. T. y Escalante-Estrada, Y. I. 2014. Tasa de crecimiento de biomasa y rendimiento de frijol en función del nitrógeno. *Ciencia y tecnología agropecuaria de México*, 2: 1-8.
- Eskin, N. M. y Wiebe, S. 1983. Changes in phytase activity and phytate during germination of two fababean cultivars. *Journal of Food Science*, 48: 270-271.
- Gatt, S. y Baker, E. A. 1970. Purification and separation of α - and β -galactosidases from spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*, 206: 125-135.
- Gaudreault, P.-R. y Webb, J. A. 1983. Partial purification and properties of an alkaline α -galactosidase from mature leaves of *Cucurbita pepo*. *Plant Physiology*, 71: 662-668.
- Gaudreault, P. R. y Webb, J. A. 1982. Alkaline α -galactosidase in leaves of *Cucurbita pepo*. *Plant Science Letters*, 24: 281-288.
- Gomes Basso Los, F., Zielinski, A. A. F., Wojcicchowski, J. P., Nogueira, A. y Demiate, I. M. 2018. Beans (*Phaseolus vulgaris* L.): whole seeds with complex chemical composition. *Current Opinion in Food Science*, 19: 63-71.
- Grewal, A. y Jood, S. 2006. Effect of processing treatments on nutritional and antinutritional contents of green gram. *Cereal Chemistry*, 30: 535-546.

- Hamerstrand, G., Black, L. y Glover, J. 1981. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry*, 58: 42-45.
- Hayat, I., Ahmad, A., Masud, T., Ahmed, A. y Bashir, S. 2014. Nutritional and health perspectives of beans (*Phaseolus vulgaris* L.): an overview. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54: 580-592.
- Hernández, C. J. y Escuerdo, A. C. J. A. M. 1993. Efecto de la cocción sobre algunas características nutricionales del frijol. *Agronomía Mesoamericana*, 4: 42-47.
- Iyer, V., Salunkhe, D., Sathe, S. y Rockland, L. B. J. P. F. H. N. 1980. Quick-cooking beans (*Phaseolus vulgaris* L.): II. Phytates, oligosaccharides, and antienzymes. *Qualitas Plantarum Plant Foods Human Nutrition*, 30:45-52.
- Jood, S., Mehta, U., Singh, R., Bhat, C. M. 1985. Effect of processing on flatulence-producing factors in legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 268-271.
- Kon, S. J. J. o. F. S. 1979. Effect of soaking temperature on cooking and nutritional quality of beans. *Journal of Food Science*, 44:1329-1335.
- Leyva Trinidad, D. A. y Pérez Vázquez, A. 2015. Pérdida de las raíces culinarias por la transformación en la cultura alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6: 867-881.
- Lo Turco, V., Potorti, A. G., Rando, R., Ravenda, P., Dugo, G. y Di Bella, G. 2016. Functional properties and fatty acids profile of different beans varieties. *Natural Product Research*, 30: 2243-2248.
- Ma, Z., Boye, J. I. y Hu, X. J. L. 2018. Nutritional quality and techno-functional changes in raw, germinated and fermented yellow field pea (*Pisum sativum* L.) upon pasteurization. *Food Science and Technology*, 92: 147-154.
- Machaiah, J. P. y Pednekar, M. 2002. Carbohydrate composition of low dose radiation-processed legumes and reduction in flatulence factors. *Food Chemistry*, 79: 293-301.
- McKee, L. H. 1995. Microbial contamination of spices and herbs: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 28: 1-11.
- Meléndez Torres, J. M. y Cañez De la Fuente, G. M. 2009. La cocina tradicional regional como un elemento de identidad y desarrollo local: el caso de San Pedro El Saucito, Sonora, México. *Estudios Sociales (Hermosillo, Son.)*, 17:181-204.
- Njoumi, S., Josephe Amiot, M., Rochette, I., Bellagha, S. y Mouquet-Rivier, C. 2019. Soaking and cooking modify the alpha-galacto-oligosaccharide and dietary fibre content in five Mediterranean legumes. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70: 551-561.
- Parmar, N., Singh, N., Kaur, A. y Thakur, S. 2017. Comparison of color, anti-nutritional factors, minerals, phenolic profile and protein digestibility between hard-to-cook and easy-to-cook grains from different kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions. *Journal of Food Science and Technology*, 54: 1023-1034.
- Pérez-Ramírez, I. F., Becerril-Ocampo, L. J., Reynoso-Camacho, R., Herrera, M. D., Guzmán-Maldonado, S. H. y Cruz-Bravo, R. K. 2018. Cookies elaborated with oat and common bean flours improved serum markers in diabetic rats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98: 998-1007.
- Rehman, Z.-u. y Shah, W. 2005. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chemistry*, 91: 327-331.
- Revilla, I. 2015. Chapter 40 - Impact of Thermal Processing on Faba Bean (*Vicia faba*) Composition. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 337-343.
- Sánchez-Mata, M. C., Peñuela-Teruel, M. J., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C. y Torija-Isasa, M. E. 1998. Determination of mono-, di-, and oligosaccharides in legumes by high-performance liquid chromatography using an amino-bonded silica column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46. 3648-3652.
- Serna-Cock, L., Pabón-Rodríguez, O. V. y Quintana-Moreno, J. D. 2019. Efectos de la fuerza iónica y el tiempo de remojo de legumbres secas sobre sus propiedades tecnofuncionales. *Información Tecnológica*, 30: 201-210.
- Shimelis, E. A. y Rakshit, S. K. 2007. Effect of processing on antinutrients and in vitro protein digestibility of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties grown in East Africa. *Food Chemistry*, 103: 161-172.
- Suhr, K. I. y Nielsen, P. V. 2003. Antifungal activity of essential oils evaluated by two different application techniques against rye bread spoilage fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 665-674.
- Talari, A., Shakappa, D. 2018. Effect of Domestic Processing and Crude Extract of α -Galactosidase on Oligosaccharide Content of Red Gram (*Cajanus cajan* L.) Seeds. *Current Research in Nutrition and Food Science*, 6: 852-861.
- Udendi, E., Ekwu, F. y Isinguzo, J. J. 2007. Antinutrient factors of vegetable cowpea (*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6: 194-197.
- Ulloa, J. A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J. C. y Ulloa Rangel, B. E. 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. *Revista Fuente*, 3: 5-9
- Valencia, D., Serrano, M., Lázaro, R., Latorre, M., Mateos, G. J. 2008. Influence of micronization (fine grinding) of soya bean meal and fullfat soya bean on productive performance and digestive traits in young pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 340-356.
- Wang, N., Hatcher, D. W., Tyler, R. T., Toews, R. y Gawalko, E. J. 2010. Effect of cooking on the composition of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Food Research International*, 43. 589-594.
- Xu, B. y Chang, S. K. 2009. Total phenolic, phenolic acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 4754-4764.

Actividad de extractos de plantas y hongos entomopatógenos para el control del picudo de la guayaba (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleóptera: Curculionidae

Activity of plants extracts and entomopathogenic fungi for the control of the guava weevil (*Conotrachelus dimidiatus* Champion) Coleoptera: Curculionidae

Ernesto Cerna-Chávez¹, Karla Vanessa De Lira-Ramos¹, Yisa María Ochoa-Fuentes¹, Juan Carlos Delgado-Ortiz^{*2}, Melchor Cepeda-Siller¹, Ernesto González-Gaona³

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Calzada Antonio Narro No. 1923 col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

² Catedrático CONACYT- Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología Agrícola, Calzada Antonio Narro No. 1923 col. Buenavista, C.P. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Pabellón, Carretera Aguascalientes-Zacatecas km 32.5, Pabellón de Arteaga, Aguascalientes, México. CP. 20660. México.

RESUMEN

El picudo de la guayaba es el principal problema fitosanitario, ocasionando pérdidas del 60 % en la producción; el principal método de control del picudo de la guayaba es la aplicación de insecticidas químicos como el paratión metílico y el malatión. El objetivo del estudio fue evaluar la eficiencia de hongos entomopatógenos en combinación con diferentes extractos vegetales en el control de *Conotrachelus dimidiatus* bajo condiciones de laboratorio. Se evaluó la efectividad biológica de cepas nativas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, la susceptibilidad del picudo de la guayaba a extractos vegetales, así como la compatibilidad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* con los extractos vegetales (pimienta y semilla de jícama) para el control del picudo. Se calculó la CL_{50} de las cepas que presentaron mayor patogenicidad sobre los adultos de *C. dimidiatus*, posteriormente estos fueron expuestos a las CL_{50} y concentraciones subletales de los extractos. Los resultados demostraron que las cepas de *B. bassiana* fueron patogénicas para el insecto. El extracto de pimienta y semilla de jícama mostraron actividad insecticida con al menos un 80 % de mortalidad. Las mezclas entre los hongos y los extractos registraron mortalidades del 90 %.

Palabras Clave: Concentración subletal, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, mortalidad, *Pachyrhizus erosus* y *Piper nigrum*.

SUMMARY

The guava weevil is the main phytosanitary problem, causing production losses of up to 60 %. The main control method of the guava weevil is the application of chemical insecticides such as methyl parathion and malathion. The objective of the study was to evaluate the efficiency of entomopathogenic fungi in combination with different plant extracts in the control of *Conotrachelus dimidiatus* under laboratory conditions. We evaluated the biological effectiveness of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* native strains, the susceptibility of the guava weevil to vegetable ex-

tracts (pepper and jicama seed), as well as the compatibility of *B. bassiana* and *M. anisopliae* with the vegetable extracts for weevil control. The strains LC_{50} was calculated, from the strains that presented greater pathogenicity on adults of *C. dimidiatus*, later these were exposed to the LC_{50} and sublethal concentrations of the extracts. The results showed that the *B. bassiana* strains were pathogenic for the insect. Pepper extract and jicama seed showed insecticidal activity. Mixtures between fungi and extracts recorded mortalities of 90 %.

Key words: LC_{50} , sublethal concentration, *B. bassiana*, *M. anisopliae*, mortality, *Pachyrhizus erosus* and *Piper nigrum*.

INTRODUCCIÓN

En México se tiene registrada una superficie de 23 mil hectáreas destinadas al cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.), distribuidas en 20 entidades federativas. Las regiones productoras más importantes se localizan en los estados de Michoacán, Aguascalientes y Zacatecas, representando el 90 % de la superficie total (SIAP, 2018).

El principal problema fitosanitario que afecta al cultivo es el picudo de la guayaba *Conotrachelus dimidiatus* (Champion), generando daños en el fruto a partir de la oviposuras de las hembras y la fermentación de los frutos derivado del desarrollo de las larvas al interior de los frutos (Vargas-Madriz et al., 2016; 2018). Si no se le controla oportunamente a *C. dimidiatus* puede ocasionar pérdidas del hasta 60 % de la producción; siendo que se encuentra ampliamente distribuido en el estado de Morelos (Muñiz y González, 1982), Aguascalientes, Zacatecas (Tafuya et al., 2010), Tabasco (Sánchez-Soto, 2011), además se tiene registro de su distribución en la zona guayabera de Jalisco y Querétaro donde causó la pérdida total de la producción (Vargas-Madriz et al., 2016). Por otro lado, en Aguascalientes y Guanajuato se registró la presencia de otra especie *Conotrachelus copalensis* (Salas-Araiza y Romero-Nápoles, 2012).

*Autor para correspondencia: Juan Carlos Delgado-Ortiz
Correo electrónico: moe_788@hotmail.com

El principal método de control del picudo de la guayaba se basa en la aplicación de insecticidas químicos como el paratión metílico y el malatión (Vargas-Madriz *et al.*, 2018), siendo ya se han determinado la presencia de organofosforados como el disulfotón en frutas como: la guayaba, papaya y mango (Jaramillo *et al.*, 2016); por lo que el control biológico, es una alternativa con potencial especialmente en la utilización de hongos entomopatógenos, los cuales se han tratado de implementar en el manejo de este cultivo, sin embargo, no se han obtenido resultados satisfactorios debido a la aplicación incorrecta (González *et al.*, 2008). Los hongos entomopatógenos se caracterizan por ser versátiles, debido a su infectividad por contacto y a su amplio rango de huéspedes que a menudo resultan en epizootias naturales (Vega *et al.*, 2009). Los hongos que habitan el suelo, como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se consideran agentes de control biológico prometedores para el control de plagas (Leger *et al.*, 1996). Estos hongos se han usado con éxito en el control de *Conotrachelus nenuphar* ocasionando mortalidad del 89 % (Alston *et al.*, 2005); en larvas de *Curculio nucum* L. se registró un rango de mortalidad de 52-80 % con *M. anisopliae* y de 40-52 % para *B. bassiana* (Batalla-Carrera *et al.*, 2013); se ha registrado en *Curculio caryae* una mortalidad del 95 % a los tres días posteriores a la aplicación de *B. bassiana* (Shapiro-Ilan *et al.*, 2004); así como *B. bassiana* ocasionó el 100 % de mortalidad en *Callosobruchus maculatus* a los seis días después de la aplicación del tratamiento. Mientras que *M. anisopliae* alcanza el 100% de mortalidad en ocho días posteriores al tratamiento (Cherry *et al.*, 2005).

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas tiene la ventaja de no contaminar debido a que estas sustancias son degradadas rápidamente en el ambiente (Iannacone y Lamas, 2002). Se conocen más de 1,600 especies de plantas con propiedades insecticidas, atrayentes, repelentes, estimulantes o inhibitorias de la ovoposición y la alimentación y como confusores sexuales (Silva *et al.*, 2003). Por ejemplo, se reporta que la rotenona se extrae de oleorresinas de la semilla de jícama (*Pachyrhizus erosus*) y que actúan como insecticida para el control del gorgojo (*Acanthoscelides obtectus*) del frijol almacenado (Andrés *et al.*, 2009). También se ha reportado en *Piper nigrum* L. compuestos como alcaloides, amidas, compuestos fenólicos, terpenos, flavonoides, con potencial para el control de plagas y enfermedades (Shirley *et al.*, 2017); ocasionando mortalidad del 80% en poblaciones del gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*) (Salvadores *et al.*, 2007).

Es necesario el estudio de la interacción con extractos vegetales y hongos entomopatógenos, debido a que algunos extractos vegetales influyen en parámetros como el crecimiento vegetativo, esporulación y germinación de conidios y en ocasiones se origina una compatibilidad entre ellos (Mertz *et al.*, 2010; Formentini *et al.*, 2014), en la búsqueda de alternativas para el manejo de *Sitobion avenae* (Fab.) se ha evaluado la compatibilidad entre extractos vegetales (eucalipto y neem) y hongos entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*); con las cual no solo se ha incrementado

la mortalidad del insecto; sino que también se ha alterado negativamente la fecundidad de *S. avenae* (Ali *et al.*, 2018). Por otro lado, estudios recientes demostraron la eficiencia de aislados de *Metarhizium* sp. y *Beauveria* sp. en combinación con aceite vegetal de girasol la cual incrementó la mortalidad de *Conotrachelus psidii* en un rango del 57.3-95.3 % en comparación con la aplicación de los hongos solos (Brito *et al.*, 2008). Debido a que el manejo tradicional de *Conotrachelus dimidiatus* se basa en el control químico, la búsqueda de alternativas para su manejo se vuelve vital, derivado de la residualidad de los insecticidas en la fruta. Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de tratamientos con hongos entomopatógenos en combinación con diferentes concentraciones de extractos vegetales en el control de *Conotrachelus dimidiatus* bajo condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de insectos

Se recolectaron adultos de *C. dimidiatus* durante los meses de junio y julio del 2018 en huertas de guayaba de la localidad de Colomos, municipio de Calvillo, Aguascalientes (21° 52' 33.9" L, 102° 39' 39.8", 1,728 msnm). Se depositaron en recipientes de plástico de 15 cm de diámetro por 25 cm de alto y se mantuvieron con una dieta a base de guayaba fresca y hojas de guayabo (Brito *et al.*, 2008) en una cámara bioclimática (marca Binder®) a una humedad relativa de 30% y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad a 25°C en el día y 24°C durante la noche, la crianza de los insectos se desarrolló en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro campus Saltillo. La identificación del insecto fue realizada en base a las características reportadas por (Muñiz-Vélez y González, 1982; Salas-Araiza y Romero-Nápoles, 2012) insectos de color rojizo con pubescencia densa de color amarilla en forma de "V" invertida en el pronoto que se extiende hasta el húmero, crestas elitrales, mesosterno cóncavo entre las coxas medias, así como la distribución regular de puntos más o menos profundos en el metasterno.

Extractos vegetales

La semilla de jícama (*Pachyrhizus erosus*) y la pimienta (*Piper nigrum* L.) se adquirieron en el mercado local de Saltillo. Ambos materiales se trituraron en un molino (Hamilton Beach® modelo Custom Grind™ Deluxe) hasta obtener un polvo fino, y se almacenaron a temperatura ambiente en recipientes cerrados en oscuridad hasta su uso.

La extracción se realizó con el sistema Soxhlet, de acuerdo a la técnica propuesta por Biswas *et al.* (2013), en una relación 1:4 de material vegetal finamente molido (62.5 g) y etanol (250 mL). El solvente se llevó a ebullición generando un flujo continuo sobre el material vegetal situado en la cámara de extracción a una temperatura de 65 °C durante cinco ciclos. Una vez obtenido el extracto, se colocó en frascos ámbar y se refrigeró a una temperatura de 4 °C.

Selección de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* patógenas para *C. dimidiatus*

Los aislamientos de *Beauveria bassiana* (BbC2, BbC4, BbC18, BbC20) y dos de *Metarhizium anisopliae* (MaC10 y MaC21), fueron proporcionados por el laboratorio de toxicología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; las cuales se cultivaron en cajas Petri que contenían medio Agar Papa Dextrosa adicionado con 0.04 % de extracto de levadura (PDAY), a 25 ± 2 °C. Se prepararon las suspensiones de esporas como lo indica Quintela y McCoy (1997), las cuales se dispusieron en matraces Erlenmeyer conteniendo 50 mL de agua destilada estéril y Tween 80 al 0.05 %. La concentración de la suspensión de esporas se determinó en un hemocitómetro, ajustándose a 1×10^5 , 1×10^7 y 3×10^8 conidios/mL.

Para cada repetición se seleccionaron diez insectos adultos sin sexar con tres repeticiones por tratamiento, tomando para los ensayos a los insectos que mostraron una mayor movilidad y que no presentaban movilidad anormal. Los adultos se sumergieron en las suspensiones de esporas fúngicas durante 30 s, y se colocaron en papel secante por 3-5 minutos para retirar el exceso de humedad y posteriormente se mantuvieron en cajas Petri revestidas con papel filtro (Quintela y McCoy, 1997) en la cámara bioclimática, bajo las condiciones descritas anteriormente. Se registró la mortalidad de los picudos cada 24 h durante 10 días después de la inoculación. Para confirmar la muerte por infección del hongo, los insectos muertos se colocaron en hipoclorito de sodio al 5 % durante 30 s y se enjuagaron en tres ocasiones, antes de colocarlos en cámaras húmedas a 25 °C (Brito et al., 2008). Con los datos obtenidos se estimó el porcentaje de mortalidad corregida (MC) con la fórmula de Abbott (1925) $[MC = ((\% \text{ Mortalidad tratamiento} - \% \text{ mortalidad testigo}) / (100 - \% \text{ mortalidad testigo})) * 100]$, en los tratamientos que así lo requirieron, siendo el porcentaje de mortalidad el criterio de selección

Actividad insecticida de extractos vegetales contra *C. dimidiatus*

Para la preparación de las diferentes concentraciones de los extractos; los extractos crudos obtenidos se considerados al 100 %, del cual se preparó una concentración madre al 80 % (v/v) con agua destilada estéril, esta concentración se diluyó en series al 50 %. Las concentraciones finales evaluadas fueron 80 %, 40 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2.5 % y 1.25 % más un testigo negativo con agua destilada estéril. A todos los tratamientos se les agregó Tween 80 (0.05 %, v/v). Los adultos se sumergieron en las preparaciones durante 30 s, y se colocaron en papel secante por 3-5 minutos para retirar el exceso de humedad y posteriormente se mantuvieron en cajas Petri revestidas con papel filtro; a temperatura de 25 ± 1 °C, con una humedad relativa de 30 % y fotoperiodo de 12:12 h luz/oscuridad (Quintela y McCoy, 1997). Se hicieron observaciones de comportamiento (locomoción y alimentación) y mortalidad cada 24 h durante tres días (Brito et al., 2008). Se ajustaron los datos de mortalidad como se indicó en la sección anterior. Las líneas de respuesta dosis-mortalidad para

cada extracto se obtuvieron mediante regresiones lineales y análisis estadístico Probit y así determinar las CL_{50} y las dosis sub-letales CL_{25} y CL_{10} para continuar con el bioensayo de combinación de extractos vegetales con hongo entomopatógenos.

Aplicación de los hongos patógenos en combinación de los extractos vegetales sobre *C. dimidiatus*

Todas las preparaciones de las combinaciones de los entomopatógenos (a 1×10^8 conidios/mL) y los extractos de plantas (CL_{50} y dosis subletales) se hicieron en Tween 80 (0.05 %) (Quintela y McCoy, 1997). Una concentración subletal a aquella que no causa mortalidad de los insectos, pero que provoca un aumento en la susceptibilidad del huésped a las infecciones fúngicas (Brito et al., 2008).

Para cada tratamiento (dosis subletal/hongo entomopatógeno), para cada repetición se seleccionaron diez insectos adultos con tres repeticiones por tratamiento. Los insectos se trataron como se indicó anteriormente, sumergiéndolos por 30 segundos en una preparación que contenía la mezcla de la suspensión de esporas y de los extractos vegetales. Las condiciones del ensayo y el registro de mortalidad se realizaron como se indicó anteriormente. La mortalidad de los insectos en los tratamientos fue ajustada con la fórmula de Abbott (1925). Adicionalmente, se confirmó la micosis de los insectos muertos, colocando los insectos muertos en cámaras húmedas. Los datos de la mortalidad se sometieron a un análisis Probit por el método de máxima verosimilitud para determinar la CL_{50} y el tiempo letal medio (TL_{50}) para cada tratamiento.

Diseño experimental y análisis de datos

Las evaluaciones fueron realizadas bajo un diseño completamente al azar, las líneas de respuesta dosis-mortalidad para cada extracto se obtuvieron mediante regresiones lineales y análisis estadístico Probit. Los datos de mortalidad se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ utilizando con el software estadístico SAS System V.9.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de *B. bassiana* y *M. anisopliae* patógenas para *C. dimidiatus*

Los resultados de las seis cepas de hongos entomopatógenos evaluadas, solo tres cepas de *B. bassiana* fueron patógenas a *C. dimidiatus*. Estas tres cepas mostraron variaciones en su virulencia, siendo la cepa BbC4 (en concentración de 3×10^8 conidios/mL) la que ocasionó la mayor mortalidad (53 %), seguida por la cepa BbC18 con 27 % y por último la cepa BbC20 con 19 %, mientras que las cepas BbC2, MaC10 y MaC21 no mostraron patogenicidad. En el Tabla 1 se muestran las CL_{50} de las cepas de *B. bassiana* patógenas al picudo. Con base a los resultados obtenidos, las cepas seleccionadas para probar la actividad insecticida de las mezclas de esporas fúngicas y extractos vegetales fueron: BbC4, BbC18 y BbC20.

Tabla 1. CL₅₀ de cepas patogénicas de *Beauveria* sp. para *C. dimidiatus*.
Table 1. CL₅₀ of pathogenic *Beauveria* sp. strains for *C. dimidiatus*.

Cepa*	CL ₅₀ ^{ab}	Intervalo de confianza al 95 %	Ecuación de regresión
BbC4	2.0 x 10 ⁸	1 x 10 ⁸ - 5 x 10 ⁸	y=0.61x+0.07
BbC18	1.7 x 10 ¹⁰	1 x 10 ⁹ - 1.6 x 10 ¹³	y=0.54x+0.06
BbC20	8.0 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹ - 4.6 x 10 ¹²	y=2.35x+0.28

^a CL₅₀: Concentración letal 50. ^b concentración expresada en conidias mL⁻¹.
 * Las cepas BbC2, MaC10 y MaC21 no mostraron patogenicidad sobre *C. dimidiatus*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Cherry et al. (2005) en donde confirmaron una mayor mortalidad de insectos *C. maculatus* tratados con *B. bassiana* fue mayor (100 %) que los tratados con *M. anisopliae* (83 %). Se han reportado efectos de *B. bassiana* en otros curculiónidos, como el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae* L. (Coleóptera: Curculionidae), en el cual causó una mortalidad del 75.8 % a concentración de 3.9x10⁷ conidias/mL, después de 25 días de la aplicación del tratamiento (Sheeba et al., 2001). Por otra parte, se ha reportado que el picudo de la guayaba (*C. psidii*) muestra una alta tolerancia a las infecciones fúngicas, dado que en estudios previos se observó que aislados de *B. bassiana* causaron mortalidad variable de 48-73 % (Brito et al., 2008).

Actividad insecticida, CL₅₀ y concentraciones subletales de extractos vegetales contra *C. dimidiatus*

La mortalidad que fue registrada para el extracto crudo de pimienta al 40 % fue superior al 80 % mientras que con el extracto de semilla de jícama se obtuvo una mortalidad del 82.8 %. En la Tabla 2, se muestran los valores estimados para las CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₀ de los extractos crudos de pimienta y semilla de jícama.

Con respecto a la actividad insecticida de los extractos de pimienta, se han aislado varias amidas con actividad insecticida, tales como la pipericida, (*E, E*) -*N*- (2-metilpropil) -2,4,12-tridecadienamida, y (*E, E, E*) -11- (1,3-benzodioxol-5) yl) -*N*- (2-metilpropil) - 2,4,10-undecatrien-amida (Miyakado et al., 1989; Su y Horvat, 1981). Estos han causado efectos tóxicos para las moscas domésticas (*Musca domestica* L.), gorgojos del arroz (*Sitophilus oryzae* L.) y el gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus* F.) (Scott y McKibben, 1978; Su y Horvat, 1981). Además, se han registrado en el gorgojo del

Tabla 2. CL₁₀, CL₂₅ y CL₅₀ estimadas para los extractos vegetales con actividad insecticida sobre *C. dimidiatus*.

Table 2. Estimated CL₁₀, CL₂₅ y CL₅₀ for plant extracts with insecticidal activity on *C. dimidiatus*.

Extracto	CL ₅₀ ^a	Intervalo de confianza 95 %	CL ₂₅ ^b	CL ₁₀ ^c	Ecuación de la regresión
Semilla de Jícama	48.91	20.96-1387	30.39	19.81	y=1.38x+0.84
Pimienta	19.88	17.57-22.76	11.16	6.64	y=0.09x+0.07

^a CL₅₀: Concentración letal 50. ^b CL₂₅: Concentración letal 25. ^c CL₁₀: Concentración letal 10.

maíz (*Sitophilus zeamais*) porcentajes de mortalidad de 83-100 % a concentraciones del 1-4 % (Salvadores et al., 2007). En adultos de *Sitophilus zeamais* se ha reportado un 79.25 % de repelencia con extractos de pimienta, con relación al testigo (Assis Cardoso et al., 2014).

Con el extracto de semilla de jícama al 80 % se presentó una mortalidad de 82.76 %; además, se observó una disminución en la alimentación en los insectos tratados, en comparación con la actividad de los insectos del testigo. En ambos extractos, las concentraciones que causaron los mayores porcentajes de mortalidad fueron mayores a los valores reportados por Andrés et al. (2009), quienes encontraron que la rotenona de las oleorresinas de la semilla de jícama en concentraciones de 0.05 y 0.06 g/mL, controlaron en semilla de frijol almacenado la incidencia de *Acanthoscelides obtectus* (Say.) en 95 y 100 %, respectivamente. La rotenona es el principal metabolito secundario presente en las oleorresinas extraídas de las semillas de jícama que presentan acción por contacto, ingestión o como repelente. Este flavonoide actúa en la mitocondria inhibiendo el transporte de electrones del NADH para la fosforilación de ADP a ATP, por lo tanto, el insecto disminuye el consumo de oxígeno, sufre depresión respiratoria y ataxia que causa convulsiones, parálisis y muerte (Silva et al., 2002). En otro estudio, González et al. (2008) realizaron experimentos en campo contra adultos de *C. dimidiatus*, registrando un nivel de control similar al producido con malatión y la mezcla de ajo + semilla de jícama (7.25 y 6.98 % de fruta dañada, respectivamente) comparado con los testigos que presentaron niveles de daño del 28 % en la fruta.

Aplicación de los hongos entomopatógenos en combinación de los extractos vegetales sobre *C. dimidiatus*

Las cepas de *B. bassiana* (BbC4, BbC18 y BbC20) mostraron una interacción positiva cuando fueron evaluadas de manera simultánea con las CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₀ de los extractos vegetales. La combinación de las cepas con el extracto de pimienta aumentó significativamente ($p < 0.05$) la mortalidad en comparación de la aplicación individual de los hongos (BbC18 y BbC20). Mientras que, en combinación de los hongos con las CL₅₀, CL₂₅ y CL₁₀ del extracto de semilla de jícama, se observó una mortalidad de 90 % (Tabla 3), siendo las combinaciones de los BbC18 y BbC20 con las CL₂₅ y CL₁₀ las que superaron la mortalidad registrada en los insectos únicamente tratados con *B. bassiana*. Adicionalmente se observó un cambio en el comportamiento de los insectos como un menor consumo de alimento y menor movilidad. Esto pudo deberse a que este hongo produce toxinas como la bassianolide que actúa como factores de virulencia y la beauvericina que es tóxica para algunos insectos, y que se ha reportado juega un papel significativo en la virulencia (Vega et al., 2012).

Brito et al. (2008), señalan que es poco probable que las aplicaciones de hongos entomopatógenos por sí solas sean eficientes para el control del gorgojo de la guayaba *C. psidii*, dada su alta tolerancia a las inoculaciones fúngicas en condiciones ideales de laboratorio; sin embargo, Brito et al.

Tabla 3. Mortalidad de adultos de *C. dimidiatus* infectados con *B. bassiana* en combinación con extractos de pimienta o semilla de jícama.**Table 3.** Mortality of adult *C. dimidiatus* infected with *B. bassiana* in combination with pepper extract or jicama seeds.

Tratamiento	Porcentaje de mortalidad (media ± SD)	
	Pimienta	Semilla de jícama
CL ₅₀ + BbC4	60.0 ± 10.00 bc	66.67 ± 20.81 abc
CL ₂₅ + BbC4	13.33 ± 5.77 d	36.67 ± 11.54 bcd
CL ₁₀ + BbC4	23.33 ± 23.09 d	16.67 ± 11.54 d
CL ₅₀ + BbC18	83.33 ± 11.54 ab	76.67 ± 5.77 ab
CL ₂₅ + BbC18	30.0 ± 10.0 cd	40.00 ± 26.45 bcd
CL ₁₀ + BbC18	40.0 ± 0 cd	43.33 ± 15.27 abcd
CL ₅₀ + BbC20	93.33 ± 5.77 a	90.00 ± 10.00a
CL ₂₅ + BbC20	36.66 ± 15.27 cd	26.67 ± 15.27 cd
CL ₁₀ + BbC20	13.33 ± 5.77d	23.33 ± 25.16 cd

* Valores en la misma columna seguidos con la misma letra no presentan diferencia significativa ($\alpha = 0.05$). SD=Desviación estándar.

(2008) obtuvieron aumentos significativos en la mortalidad y la velocidad de muerte del hospedador utilizando aceite vegetal e imidacloprid. Por su parte, Malik et al. (2016) lograron una mortalidad del 100 % en el picudo rojo de las palmeras (*Rhynchophorus ferrugineus*) después de 15 días de tratamiento con *B. bassiana* (1×10^6 conidios/mL) en combinación con imidacloprid ($1 \mu\text{L}$). Estos estudios sugieren que el uso de simultáneo de un insecticida químico mejora la patogenicidad de los hongos entomopatógenos. Ya se ha establecido que los insecticidas sintéticos causan cambios fisiológicos o estrés químico en los insectos y posteriormente, las esporas de los hongos penetran fácilmente en la cutícula del insecto y la penetración exitosa produce un crecimiento vegetativo del hongo que afecta la nutrición y finalmente causan la muerte (Inglis et al., 2001; Shahina et al., 2009).

El estudio de Jaramillo et al. (2005) reportaron el efecto aditivo de aplicaciones conjuntas de imidacloprid y *M. anisopliae* para el control del insecto *Cyrtomenus bergi*. Estos autores encontraron un aumento en la mortalidad del 40 % al 88 % cuando se combinó el hongo con este insecticida (imidacloprid). Además, se ha reportado que la combinación de extracto de higuera/extracto de Chile/*B. bassiana* redujo poblaciones de *Sphenarium purpurascens* Charp en un 81 % en condiciones de campo (Jorge et al., 2016), aunque también se ha demostrado que en altas concentraciones inhibe la germinación y disminuye la viabilidad de las conidios de *B. bassiana* (Mamprim et al., 2014).

Cabe destacar que Ali et al. (2018), al evaluar la compatibilidad de extractos vegetales (eucalipto y neem) con hongos entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*), para el control de *S. avenae* obtuvieron mortalidad de 54-87 % en las mezclas, así como un efecto negativo en la fecundidad al ser tratadas con *B. bassiana*/extracto de eucalipto.

Los aislamientos de *B. bassiana* en combinación con las CL₅₀ de pimienta y semilla de jícama mostraron diferencias en los valores de TL₅₀ con respecto a las dosis subletales,

requiriendo un menor tiempo de muerte a la CL₅₀ de ambos extractos (Tabla 4). Los menores tiempos de respuesta se observaron con la combinación CL₅₀+BbC20 (extracto de pimienta), siendo un tiempo de 5.8 días para el extracto de pimienta y de 3.8 días para el tratamiento con semilla de jícama. Estos valores son similares con lo reportado por Brito et al. (2008), para el control de *C. psidii*, donde ellos registraron valores de 5.3-8.9 días en aislados de *B. bassiana* en combinación con un insecticida químico (imidacloprid). Sin embargo, Suárez-Gómez (2009) estimó un TL₅₀ para *B. bassiana* sobre *Sitophilus zeamais* de seis días después de la aplicación a una concentración de 1×10^6 conidios/mL. Los aislamientos de hongos entomopatógenos con TL₅₀ mayores de 14 días se consideran no patogénicos (Samuels et al., 1989). Debido a que los TL₅₀ de las dosis subletales con el extracto de semilla de jícama en este estudio, se registraron por debajo de los valores reportados, por se consideran favorables para el control del picudo. Lo anterior concuerda con los efectos sinérgicos reportados por Quintela y McCoy (1997), quienes analizaron la sinergia entre combinaciones de entomopatógenos (*B. bassiana* y *M. anisopliae*) y el imidacloprid, logrando reducir el tiempo letal (TL₅₀) en poblaciones de *Diaprepes abbreviatus* hasta en 2.0 y 2.5 días. Asimismo, obtuvieron un 96 % de mortalidad en combinación de *B. bassiana* con 500 ppm de imidacloprid.

Tabla 4. Tiempo letal (TL₅₀) para cepas de *B. bassiana* en combinación con extractos vegetales sobre el adulto de *C. dimidiatus*.**Table 4.** Lethal time (TL₅₀) for the combination of *B. bassiana* strains with plant extracts on adult *C. dimidiatus*.

Tratamiento	TL ₅₀ (Días)	Intervalo de confianza 95 %	Intervalo de confianza 95 %	
			Pimienta	Semilla de jícama
CL ₅₀ + BbC4	14.4	(7.8 - 32.2)	4.7	(3.7 - 5.8)
CL ₂₅ + BbC4	17.3	(13.8 - 28)	8.6	(8.2 - 9.2)
CL ₁₀ + BbC4	100	(30.2 - 523.5)	9.2	(8.8 - 9.7)
CL ₅₀ + BbC18	7.95	(6.2 - 13.29)	5.5	(3.7 - 8.4)
CL ₂₅ + BbC18	8.9	(8.4 - 9.5)	8.9	(8.4 - 9.5)
CL ₁₀ + BbC18	10.2	(9.7 - 11)	7.9	(7.5 - 8.4)
CL ₅₀ + BbC20	5.8	(5.1 - 6.7)	3.8	(2.7 - 4.9)
CL ₂₅ + BbC20	12.4	(11.1 - 14.6)	8.3	(7.8 - 8.8)
CL ₁₀ + BbC20	50	(27.5 - 190)	9.2	(8.7 - 10)

CONCLUSIONES

Las combinaciones entre los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y los extractos vegetales de pimienta y semilla de jícama mostraron ser eficientes para el control de picudo de la guayaba bajo condiciones de laboratorio, siendo la cepa BbC20 la que registró la mayor mortalidad al ser combinada con los extractos vegetales. Los TL₅₀ de las dosis subletales con el extracto de semilla de jícama fueron menores a los reportados en la literatura, por lo que se consideran favorables para el control del picudo. Por lo cual se sugiere

continuar los estudios de compatibilidad y analizar el efecto de estas mezclas en poblaciones directamente en campo para evaluar su potencial control de la plaga.

REFERENCIAS

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economy Entomology*. 18: 265-267. DOI: [org/10.1093/jee/18.2.265a](https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a)
- Ali, S., Farooqi, M.A., Sajjad, A., Ullah, M.I., Qureshi, A.K., Siddique, B., Waheed, W., Sarfraz, M. y Asghar, A. 2018. Compatibility of entomopathogenic fungi and botanical extracts against the wheat aphid *Sitobion avenae* (Fab.) (Hemiptera: Aphididae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 28: 1-6. doi: [org/10.1186/s41938-018-0101-9](https://doi.org/10.1186/s41938-018-0101-9)
- Alston, D., Rangel, D., Lacey, L., Golez, H., Kim, J. y Roberts, D. 2005. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biological Control*. 35(2): 163-171. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2005.06.011](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.06.011)
- Andrés, M., Lucio, J., Juárez-Goiz, J., Muñiz, R., Hernández, S. y Elos, M. 2009. Oleoresina de jícama para controlar *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleóptera: Bruchidae) en semilla de frijol. *Agronomía Mesoamericana*. (20): 59-69. Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_mesov20n01_059.pdf
- Batalla-Carrera, L., Morton, A., Santamaria, S. y García del Pino, F. 2013. Isolation and virulence of entomopathogenic fungi against larvae of hazelnut weevil *Curculio nucum* (Coleoptera, Curculionidae) and the effects of combining *Metarhizium anisopliae* with entomopathogenic nematodes in the laboratory. *Biocontrol Science and Technology*. 23(1): 101-125. DOI: [org/10.1080/09583157.2012.741681](https://doi.org/10.1080/09583157.2012.741681)
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D. y Yadav, A. 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. *International Journal of Microbiology*. 2013: 1-7. DOI: [org/10.1155/2013/746165](https://doi.org/10.1155/2013/746165)
- Brito, E., De Paula, A., Vieira, L., Dolinski, C. y Samuels, R. 2008. Combining vegetable oil and sub-lethal concentrations of Imidacloprid with *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against adult guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae). *Biocontrol Science and Technology*. 18(7): 665-673. DOI: [10.1080/09583150802195965](https://doi.org/10.1080/09583150802195965)
- Cherry, A., Abalo, P. y Hell, K. 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*. 41(3): 295-309. DOI: [org/10.1016/j.jspr.2004.04.002](https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.04.002)
- Assis, F., Silva, P., Queiroga, V., Figueiredo, A., Cárdenas, N. y Rojas, A. 2014. Eficiencia de extractos vegetales como insecticida sobre *Sitophilus zeamais* en granos de maíz almacenados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 23(2): 57-62. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542014000200010
- Formentini, M., Alves, L., Da Silva, F. y Mamprim, A. 2014. *In vitro* assay of alternative phytosanitary products and plant extracts on *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. (Clavicipitaceae). *Revista Brasileira de Agroecologia*. 9(1): 195-204. Disponible en: <http://revistas.aba-agroecologia.org.br/index.php/rbagroecologia/article/view/13329>
- Suárez-Gómez, H. 2009. Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: hyphomycetes) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: curculionidae) plaga de maíz almacenado. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*. 4(1): 47-53. Disponible en: <https://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/138>
- González, G., Lozano, G., España, L., Tafoya, R., Padilla, R., Perales, C. y Juárez, M. 2008. Estrategias de manejo orgánico – biológico del picudo de la guayaba (*Conotrachelus* spp). Folleto Técnico Núm. 39. INIFAP-CIRNOC-Campo Experimental Pabellón, Pabellón de Arteaga, Ags. México. http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/2576/Estrategias%20de%20manejo%20organico_biologico%20del%20picudo%20de%20la%20guayaba%20conotrachelus%20spp.pdf?sequence=1
- Iannaccone, J. y Lamas, G. 2002. Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador *Chrysoperla externa*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. (65): 92-101 Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/263467252_EFECTO_DE_DOS_EXTRACTOS_BOTANICOS_Y_UN_INSECTICIDA_CONVENCIONAL SOBRE_EL_DEPREDADOR_CHRYSOPERLA_EXTERNA
- Inglis, G., Goettel, M., Butt, M. y Strasser A. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: *Fungi as Biocontrol Agents*. T.M. Butt, C. Jackson y N. Magan (eds). pp. 24-69. Wallingford, UK. CAB International. DOI: [10.1079/9780851993560.0023](https://doi.org/10.1079/9780851993560.0023)
- Jaramillo, J., Borgemeister, C., Ebssa, L., Gaigl, A., Tobón, R. y Zimmermann, G. 2005. Effects of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Foerchner (Hemiptera: Cydnidae). *Biological Control*. 34 (1): 12-20. DOI: [org/10.1016/j.biocontrol.2005.03.021](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.03.021)
- Jaramillo-Colorado, B.E., Palacio-Herrera, F., Pérez-Sierra, I. 2016. Residuos de pesticidas organofosforados en frutas obtenidas de plazas de mercado y supermercados en Cartagena, Colombia. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*. 25 (4): 39-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.14440.47363>
- Jorge, V., de los Ángeles, M., Aragón García, A., Bibbins Martínez, M.D., Castillo Hernández, D., Galicia, N. y Pérez Torres, B.C. 2016. Control de *Sphenarium purpurascens* con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(2): 235-247. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000200235
- Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. y Roberts, D. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Science*. 93: 6349-6354. DOI: [10.1073/pnas.93.13.6349](https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6349)
- Malik, M., Manzoor, M., Ali, H., Muhammad, A., Ul, S., Qasim, M., Ahmad, N., Idrees, A., Muhammm, A. y Saqib, H. 2016. Evaluation of imidacloprid and entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 4: 262-268. Disponible en: <http://www.entomoljournal.com/archives/?year=2016&vol=4&issue=1&ArticleId=814>

- Mamprim, A., Angeli, L., Silva, F., Formentini, M., Castilho, C. y Barbosa, R. 2014. Efecto de productos fitosanitarios sobre parámetros biológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae). *Revista de Protección Vegetal*. 29(2): 128-136. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n2/rpv08214.pdf>
- Mertz, N., Alves, L., Marcomini, A., de Oliveira, D. y dos Santos, J. 2010. Efeito de produtos fitossanitários naturais sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *in vitro*. *BioAssa*. 5(3): 1-10. DOI: 10.14295/BA.v5.0.71
- Miyakado, M., Nakayama, M. y Ohno, N. 1989. Insecticidal unsaturated isobutylamides: from natural products to agrochemical leads. In: *Insecticides of Plant Origin*. J.T. Arnason, B.J.R. Philogene y P. Morand (ed). pp 183-187. Washington, D.C. *ACS symposium Series*. DOI: 10.1021/bk-1989-0387.ch013
- Muñiz, V. y González, R. 1982. *Conotrachelus dimidiatus* Champ, "el picudo de la guayaba" en Morelos, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 26: 9-35.
- Quintela, E.D. y McCoy, A.W. 1997. Pathogenicity enhancement of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to first instars of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) with sublethal doses of imidacloprid. *Environmental Entomology*. 26(5): 1173-1182. DOI: [org/10.1093/ee/26.5.1173](https://doi.org/10.1093/ee/26.5.1173)
- Salas-Araiza, M. y Romero-Nápoles, J. 2012. Species of *Conotrachelus* (Coleoptera: Curculionidae: Molytinae) associated to the guava and new species description. *Revista Colombiana de Entomología*. 38(1): 124-127. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882012000100022
- Salvadores, Y., Silva, G., Tapia, M. y Hepp, R. 2007. Spices powders for the control of maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, in stored wheat. *Agricultura Técnica*. 67(2): 147-154. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/27789504_Spices_powders_for_the_control_of_maize_weevil_Sitophilus_zeamais_Motschulsky_in_stored_wheat
- Samuels, K., Heale, J. y Llewellyn, M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53: 25-31. DOI: [org/10.1016/0022-2011\(89\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(89)90070-0)
- Sánchez-Soto, S. 2011. Campeón de *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae): el picudo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en Tabasco, México. *Boletín Museo de Entomología de la Universidad Valle*. 12: 17-18
- Scott, W. y McKibben, G., 1978. Toxicity of black pepper extract to boll weevils. *Journal of Economic Entomology*. 71: 343-344. DOI: [org/10.1093/jee/71.2.343](https://doi.org/10.1093/jee/71.2.343)
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. [Consultado 05 noviembre 2019] Disponible en: <http://www.siap.s.gob.mx/>
- Shahina F., Salma J., Mehreen G., Bhatti M. y Tabassum K. 2009. Rearing of *Rhynchophorus ferrugineus* in laboratory and field conditions for carrying out various efficacy studies using EPNs. *Pakistan Journal of Nematology*. 27: 219-228. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/237547519_Rearing_of_Rhynchophorus_ferrugineus_in_laboratory_and_field_conditions_for_carrying_out_various_efficacy_studies_using_EPNs
- Shapiro-Ilan, D., Cottrell, T. E., Gardner, W. A. 2004. Trunk perimeter applications of *Beauveria bassiana* to suppress adult *Curculio caryae* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Entomological Science*. 39 (3): 337-349. Doi: doi.org/10.18474/0749-8004-39.3.337
- Sheeba, G., Seshadri, S., Raja, N., Janarthanan, S. y Ignacimuthu, S. 2001. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of the rice weevil *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Applied Entomology and Zoology*. 36: 117-120. DOI: [org/10.1303/aez.2001.117](https://doi.org/10.1303/aez.2001.117)
- Shirley, F., Yamaguchi, L., Kato, M., Lemos, O., Xavier, L., Maia, J., Ramos, A., Setzer, W. y Silva, J. 2017. Secondary metabolic profiles of two cultivars of *Piper nigrum* (black pepper) resulting from infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*. *International Journal of Molecular Science*. 18 (12): 1-17. DOI: 10.3390/ijms18122434.
- Silva, G., Lagunes, A. y Rodríguez-Sánchez, J. 2003. Control de *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) con polvos vegetales solos y en mezcla con carbonato de calcio en maíz almacenado. *Ciencia e Investigación Agraria*. 30(3): 153-160. Disponible en: <https://bibliotecadigital.infor.cl/handle/20.500.12220/26775>
- Silva, G., Lagunes, A., Rodríguez, J. y Rodríguez, D. 2002. Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa en el manejo de insectos. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 66: 4-12. Disponible en: <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6414/A2008e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Su, H. y Horvat, R. 1981. Isolation, identification and insecticidal properties of *Piper nigrum* amides. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 29: 115-118. DOI: [org/10.1021/jf00103a029](https://doi.org/10.1021/jf00103a029)
- Tafoya, F., C. Perales, E. González, y H. G. Calyecac. 2010. Fruit damage patterns caused by ovipositing females of *Conotrachelus dimidiatus* (Coleoptera: Curculionidae) in guava trees. *Psyche: A Journal of Entomology*. 2010: 1-4. DOI: 10.1155/2010/819532
- Vargas-Madriz, H., Azuara-Domínguez, A., Juan-Lara, J., Ibarra-Cortés, K., Grifaldo-Alcántara, P., Talavera-Villarreal, A., Tafoya-Rangel, F. y Lázaro-Dzul, M. 2018. Picudo de la guayaba *Conotrachelus dimidiatus* (Champion) una plaga de importancia económica para el cultivo de guayaba *Psidium guajava* L. en México. *Revista Mexicana de Fitosanidad*. 2(3): 25-38. Disponible en: [http://www.revimexfito.com.mx/files1/Remef%202_3/REMEFI_2\(3\)_25-38_2018.pdf](http://www.revimexfito.com.mx/files1/Remef%202_3/REMEFI_2(3)_25-38_2018.pdf)
- Vargas-Madriz, H., Martínez-Damian T., Lázaro-Dzul, M., Terán-Vargas, A. y Azuara-Domínguez, A. 2016. New distribution registry of guava weevil, *Conotrachelus dimidiatus* Champion, in Guava (*Psidium guajava* L.) in Mexico. *Southwestern Entomologist*. 41(3): 883-886. DOI: [org/10.3958/059.041.0332](https://doi.org/10.3958/059.041.0332)
- Vega, F., Goettel, M., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., Monzón, A., Ownley, B., Pell, J., Rangel, D. y Roy, H. 2009. Fungal entomopathogens: New insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2: 149-159. DOI: [org/10.1016/j.funeco.2009.05.001](https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001)
- Vega, F., Meyling, N., Luangsa-ard, J. y Blackwell, M. 2012. Fungal Entomopathogens. En: *Insect pathology*. F. E. Vega y H. K. Kaya (ed). pp 171-220. DOI: 10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3.

Farming with drip sea water irrigation for *Salicornia* production in Tierra del Fuego, Argentina

Agricultura con riego por goteo de agua de mar para la producción de *Salicornia* en Tierra del Fuego, Argentina

Oscar Bianciotto^{1*}, Fernando Aras Martin¹, María Elena Arce², Luciano Selzer¹, Jesús Ortega García⁴, Gea Paulo³, Leonor Angelica Galindo Cárdenas¹, Aldo Robledo¹ and Edgar Omar Rueda Puentes^{5*}

¹ Universidad Nacional de Tierra del Fuego A.I.A.S. – Argentina, Ushuaia, Tierra del Fuego, Basket 251, C.P. 9410, Ushuaia, Argentina.

² Universidad Nacional de la Patagonia, Argentina. Ciudad Universitaria Km 4, C.P. 9005 Comodoro Rivadavia, Chubut, Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – A.E.R. carretera Río Grande – Km. 21., C.P. 9007, Ushuaia, Tierra del Fuego – Argentina.

⁴ Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Sonora. Av. Universidad e Irigoyen, s/n. Col. Ortiz. Caborca, Sonora, Mex. C.P. 83621.

⁵ Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Boulevard Luis Encinas y Rosales s/n. C.P. 83000, Col Centro. Hermosillo Sonora, México.

ABSTRACT

Farming for the sustainable production of halophyte crops should begin with the popular knowledge of saline and beneficial plants. In this respect, the use of drip irrigation with a seawater supply for the production of the halophytic specie *Salicornia magellanica* was evaluated in a small-scale culture in three growth periods; a randomized design of fifteen plantings were developed in each treatment (n=15), with two irrigation flows in two plant stages (two and seven months of initial pre-planting growth in pots). The irrigation flow showed different effects on the production parameters and plant age, with highest yields recorded in more developed plants at the third season. Hydroponics with low concentration of sea water, showed a greater and significant values in survival of plants, largest length and number of shoots. These results made it possible to model the consumption of seawater for crops in Tierra del Fuego, Argentina, optimizing its use in order to reduce the cost of seawater provision for micro crops far from the sea coast.

Key words: increasing density; levels; morphology; urban space.

RESUMEN

La producción de cultivos halófitas en una agricultura sustentable, debe iniciar con el conocimiento popular de las plantas salinas y beneficiosas. Con base a lo anterior, se evaluó el uso de riego por goteo con suministro de agua de mar para la producción de la especie halófila *Salicornia magellanica* en un cultivo de pequeña escala en tres períodos de crecimiento; en cada tratamiento se desarrolló un diseño aleatorizado de quince plantaciones (n = 15), con dos caudales de riego en dos etapas de planta (dos y siete meses de crecimiento inicial pre-plantación en macetas). El caudal de riego mostró

diferentes efectos sobre los parámetros de producción y edad de la planta, donde los mayores rendimientos se registraron en plantas más desarrolladas en la tercera temporada. En la hidroponía con agua de mar las de baja concentración, tuvieron valores mayores y significativos en supervivencia de plantas, mayor longitud y número de brotes. Estos resultados permiten modelar el consumo de agua de mar para cultivos en Tierra del Fuego, Argentina, optimizando su uso con el fin de reducir el costo del suministro de agua de mar para micro cultivos alejados de la costa del mar.

Palabras claves: aumento de densidad; espacio urbano; morfología; niveles.

INTRODUCTION

Marsh ecosystems are home to most halophyte plant species that are components of the global coastal natural heritage. Those have been well studied for more than 20 years, as potential source for safe food for people (Kong and Zheng, 2014; Aarland *et al.*, 2020). This has led to pilot tests of alternative agriculture in marginal environments, which do not require fresh water for its development (Beltran-Burboa *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2013; Harrouni *et al.*, 2003ab; Davy *et al.*, 2001). Worldwide freshwater shortages, and the possibility of producing food grown with seawater, make halophytes an important future possibility for the use of coasts and salinized inland lands (Rebolloza *et al.*, 2020; Feng *et al.*, 2013; Glen *et al.*, 1998). In this way, new agricultural production systems began to emerge. The use of seawater for agriculture is an innovation in the quality food production process, based on research knowledge on the physiological mechanisms of high salinity adaptation and productive genotypes of marginal halogen and glycophyte plants at moderate salinities, with food production capacity, which has generated saline

*Autor para correspondencia: Edgar Omar Rueda Puentes
Correo electrónico: erueda04@santana.uson.mx

Recibido: 12 de agosto de 2020

Aceptado: 26 de octubre de 2020

agriculture beginning slowly around the world (Bianciotto *et al.*, 2014; Salazar *et al.*, 2014; Boscaiu and Vicente, 2013; Lieth and Moscheno 2003; Koyro and Werner, 2003). In Tierra del Fuego Province (Argentina), the most interesting halophyte *Sarcocornia magellanica* (Phil.), reclassified by M.A. Alonso and M.B. Crespo as *Salicornia* (Amerocornia) *magellanica* Piirainen and Kadereit subg. (Bianciotto *et al.*, 2004; 2006), covers around 60,000 ha of land, used only as waste dumps or oil exploitation areas, or at best, for sheep and cattle grazing (Bianciotto *et al.*, 2004; 2006).

Salicornia has begun to locally contribute as food for the population in the Patagonian region. Restaurants have integrate the product into the gastronomic charts, considering the contents of this species in essential fatty acids and salts of Calcium, Magnesium, Sodium, Potassium, trace elements, among others. It has been called the first Fuegian and Patagonian vegetable endemic to the region (Bianciotto *et al.*, 2016; 2014; Arce *et al.*, 2016).

The hypothesis proposed in this study is that under an irrigation system with an effective salinity, using seawater for *Salicornia* development, its establishment would be more successful in saline and / or coastal desert areas. Thus, it is important to determine the optimal conditions (drip irrigation system and pots), which would allow expanding the crop from small or medium scale, to urban areas. For this reason, the present work was aimed to evaluate the use of drip irrigation with seawater supply for the production of the halophytic specie *Salicornia magellanica*, considering two irrigation flows in plant stages (two months = 60 days after sowed =das=) and seven months (210 das), initial pre-planting growth in pots. Additionally, at the same time, another hydroponic growing experiment was carried out with four different seawater concentrations (0, 11, 20 and 33 g/L of salts) to determine the optimal concentration.

MATERIAL AND METHODS

Salicornia magellanica on drip seawater irrigation

An experimental design with sixty (60) plants was implemented, grown from propagation lignified stems cuttings (10 cm in length and 1 cm in diameter) from mother plants at flowering stage, from a Bay called "enclosed bay" at coordinates 54° 49' 21.95" S, 68° 19' 04.22" O. They were cultivated in small 0.5-L pots; when the lignified cuttings had two months (60 days after transplanted =dat) and seven months (210 dat) they were transplanted a second time into 3-L pots. At each plants-age treatment (60 and 210 dat), seawater irrigation with two flows of 0.7 L/h (30 plants) and 1.43 L/h (30 plants) were evaluated from two peak flow openings; each group of plants in each flow were placed under two different conditions: seven months of growth (15 plants) in spring and seven months (15 plants) in winter.

An automatic irrigation and dripper system was chosen to facilitate the regulation mechanism. It was integrated with a system of tank and sea water transport tanks (Figure 1), manifolds with closed normal solenoid valve (220 V) and regulated by a timer. Hoses with dropper of variable flow,



Figure 1. Drip irrigation system with 500 L sea water tank and hoses with variable flow dropper.

Figura 1. Sistema de riego por goteo con tanque de agua de mar de 500 L y mangueras con gotero de flujo variable.

equipped with a drill tip, allows it to be inserted into the irrigation hose and an adjustable flow peak of 35 L/h and emission radius of 30 ± 5 cm.

Thirty plants (30) were then considered for each type of flow opening, with two planting ages: fifteen (15) that spent one winter prior to the test (7 months of growth, named mature plants -MP) and fifteen (15) planted at spring (2 months of growth, named young plants -YP) for the purpose of recording and determining growth and productive variables differences. Measurements of the following biological parameters were taken in plants during three consecutive growth periods: number of green shoots, average length of green shoots (mm), length of the witness shoot (mm), biomass production by green weight ($\text{g}\cdot\text{m}^2$) and dry weight ($\text{g}\cdot\text{m}^2$). Rainwater was recorded and the amount of seawater used for each established flow rate, according the province of Tierra del Fuego conditions, was calculated.

Test Hydroponics Culture

The hydroponics culture test was carried out on square containers coated with transparent plastic LTD. Four different seawater dilutions were evaluated: 100, 50, 25 and 0 % of seawater (33, 18, 11 g/L of salts), respectively, and tap water plus urea fertilizer (2 g/L). Four repetitions were carried out of each solution. A water aeration system (fish tank aerator) with small pumps were used to recycle the culture medium. Over each seawater solution, sheets of perforated polystyrene-

ne (EPS), used to support the plants (Figure 2), were placed; one hundred fifty 10-cm long *Salicornia* cuts were grown, to achieve the same number of plant repetitions (n = 150). The plants development in each water salinity was measured, considering plant survival, length and number of shoots. The test was carried out under greenhouse conditions at 20 °C with moderated wind fluxes.



Figure 2. Hydroponics containers with plants of *Salicornia* (*Amerocornia*) *magellanica* placed in greenhouse.

Figura 2. Contenedores hidropónicos con plantas de *Salicornia* (*Amerocornia*) *magellanica* colocadas en invernadero.

Statistical Analysis

Data were analyzed under a completely randomized experimental design of repeated measures, with 2 flows, 2 ages and 15 repetitions (n = 15) for each plant age. Given the nature of the data, we chose to use three-way ANOVA under mixed linear models using the “name” package of the “R” program version 3.2.5. In addition, Principal Component Analysis was used to test the correlation between the length of shoots, number of shoots and dry weight per plant variables, given the high degree of correlation between fresh and dry weight expressed in plant or area.

RESULTS AND DISCUSSION

Salicornia magellanica on drip seawater irrigation

Based on the indicated irrigation system, Table 1 and Figure 3 show a variation between a 6.0 to 6.4 L pot for the lowest flow rate, and a 10.7 to 11.9 L pot for the highest flow rate. The above considering maintaining soil moisture for each plant at field capacity (moist soil).

Drip seawater irrigation culture and Principal component analysis

Sprout length was the only parameter where a triple interaction was found (Flow x Maturity x Growing Season) (Table 2). This is because differences depend on the development of the plants (maturity) and the growing season considered (Table 2; Figure 4). In the second period, younger plants (YP) had significant differences and longer sprout lengths with the lowest flow, while the plants with greater development (MP) had significantly longer shoots in the third period. The number of shoots was significantly higher in PM plants in the three seasons. The maturity and growth period interaction (Maturity x Season) showed a substantial change in the magnitude of the differences, but not in their sign. This increase in the number of shoots in mature plants, represented a significant increase in green and dry biomass, per plant and in standardized values (m²), in the third growing season (Table 2, 3, Figure 4).

Table 1. Average volumes in liters of total rainwater and seawater for flow rates 1 and 2 supplied to each pot per month. 0.7 L/h (flow 1) and 1.43 L/h (Flow 2).
Tabla 1. Volúmenes promedio de agua de lluvia y agua de mar totales para los caudales 1 y 2 suministrados a cada maceta por mes 0.7 L/h (flujo 1) y 1.43 L/h (flujo 2).

Months	Monthly average of Rainwater per pot (I)	Monthly average of SW (flow 1) (I:pot)	Monthly average of SW (flow 2) (I:pot)	Average total volume (SW + RW) per month for flow rate 1 (I:pot)	Average total volume (SW + RW) per month for flow rate 2 (I:pot)	% of average SW Flow 1 / % of average SW Flow 2	
	I	II	III	IV= I + II	V= I + III		
O	0,638	5,536	11,071	6,174	11,709	90%	95%
N	0,730	5,357	10,714	6,087	11,444	88%	94%
D	0,896	5,536	11,071	6,432	11,967	86%	93%
E	0,875	5,536	11,071	6,410	11,946	86%	93%
F	0,744	5,000	10,000	5,744	10,744	87%	93%
M	0,785	5,536	11,071	6,320	11,856	88%	93%

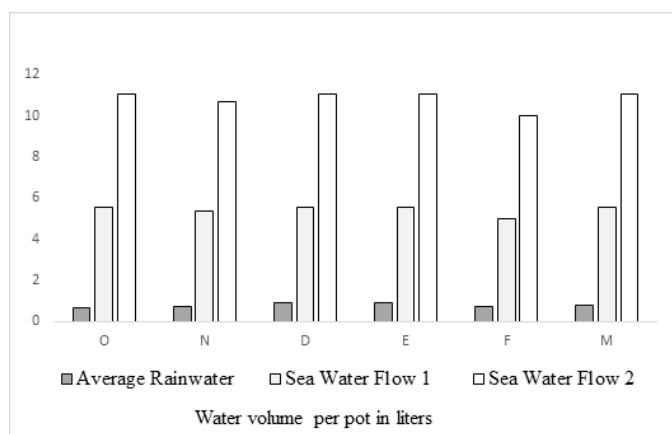


Figure 3. Average monthly volume of water (SW and RW) supplied for each flow rate and per pot in the drip irrigation system.

Figura 3. Volumen mensual promedio de agua (SW y RW) suministrada para cada caudal y por maceta en el sistema de riego por goteo.

In young plants, the flow was related to productivity (Flow x Maturity interaction). The fresh weight, both by plant and area, was significantly higher with the lowest flow (Table 2-3). Whereas the dry matter percent weight did not change significantly under any of the variables studied (Table 2, 3). There is no clear pattern between irrigation flows, but it is possible to see that the variation between periods is consistent. Plants increased productivity (green and dry weight) with the advance of the seasons (Figure 5). Analysis of major components shows that, in mature and new plants, variables length and number of shoots are poorly correlated. The dry weight is more correlated with the length of shoots in mature plants. Whereas for it shows greater correlation with the number of shoots in new plants. These results are supported by the correlation between variables (Table 3, 4; Figure 6, 7).

Table 2. Mean biological parameters of *Salicornia (Amerocornia) magellanica*, mature plants (MP) and young plants (YP) with two irrigation flows, for the 3 growth periods: number of shoots, length of shoots, length of marked bud, fresh weight per plant in grams dry matter per plant in gplant, fresh and dry weight in square meters (gm²). n = 15.

Tabla 2. Parámetros biológicos medios de *Salicornia (Amerocornia) magellanica*, plantas maduras (MP) y plantas jóvenes (YP) con dos flujos de riego, para los tres períodos de crecimiento: número de brotes, longitud de brotes, longitud de brote marcado, peso fresco por planta en gramos de materia seca por planta en gplanta, peso fresco y seco en metros cuadrados (gm²). n = 15.

	1° growing period				2° growing period				3° growing period			
	Flow 0,71 L·h		Flow 1,43 L·h		Flow 0,71 L·h		Flow 1,43 L·h		Flow 0,71 L·h		Flow 1,43 L·h	
	YP	MP	YP	MP	YP	MP	YP	MP	YP	MP	YP	MP
Sprout Number plant	7	28	6	21	10	25	9	15	18	35	15	28
Sprout Length (mm)	25,6	51,8	33,3	43,8	72,0	57,3	54,8	66,7	58,0	67,9	60,5	93,3
Marked sprout length (mm)	s/d	34,7	s/d	36,0	s/d	84,0	s/d	102,7	s/d	s/d	s/d	s/d
Green weight plant (g plant)	s/d	4,9	s/d	4,1	8,0	8,3	5,1	9,1	17,2	21,0	10,0	24,1
Dry matter plant (gplant)	s/d	0,23	s/d	0,19	0,92	0,98	0,56	0,99	1,89	2,38	1,18	2,65
Std green weight (gm ²)	s/d	88,80	s/d	73,20	144,60	150,00	91,20	163,20	309,86	378,00	180,00	434,57
Std dry matter (gm ²)	s/d	4,11	s/d	3,35	16,52	17,72	10,07	17,77	33,96	42,92	21,25	47,65

Table 3. ANOVA of three factors, Flow, Maturity, growing period and their interaction.

Chi (p).

Tabla 3. ANOVA de tres factores, flujo, madurez, período de crecimiento y su interacción.

Chi (p)

Factor	Sprout Number	Sprout Length	Green Weight	Dry Matter	Std Green Weight	Std Dry Matter	Dry matter Percentage
Flow	5,57 (0,0182)	0,76 (0,3824)	0,78 (0,3773)	1,28 (0,2576)	0,78 (0,3773)	1,28 (0,2576)	1,32 (0,2502)
Maturity	45,31 (<0,0001)	13,92 (0,0002)	11,03 (0,0009)	12,16 (0,0005)	11,03 (0,0009)	12,16 (0,0005)	0,65 (0,4185)
Growing period	62,1 (<0,0001)	139,31 (<0,0001)	95,48 (<0,0001)	122,37 (<0,0001)	95,48 (<0,0001)	122,37 (<0,0001)	1,78 (0,1818)
Flow x maturity	2,14 (0,1436)	2,76 (0,0965)	4,35 (0,0371)	3,51 (0,0609)	4,35 (0,0371)	3,51 (0,0609)	0,06 (0,8101)
Flow x growing period	0,36 (0,8340)	10,69 (0,0048)	0,24 (0,6235)	0,04 (0,8510)	0,24 (0,6235)	0,04 (0,8510)	1,98 (0,1593)
Maturity x growing period	8,99 (0,0112)	19,83 (<0,0001)	10,43 (0,0012)	11,92 (0,0006)	10,43 (0,0012)	11,92 (0,0006)	0,21 (0,6484)
Flow x maturity x growing period	0,72 (0,6967)	18,36 (0,0001)	2,49 (0,1146)	1,86 (0,1731)	2,49 (0,1146)	1,86 (0,1731)	1,1 (0,2936)

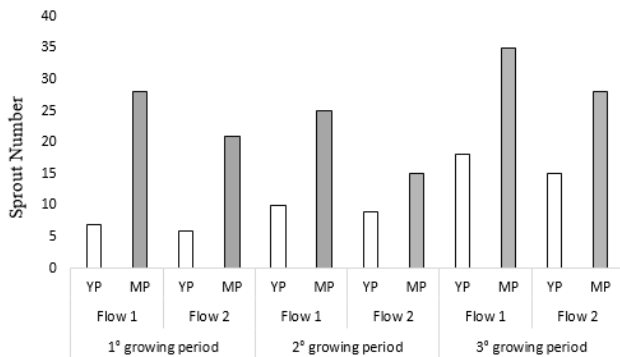


Figure 4. Interaction triple length of shoots, maturity and growth period.
Figura 4. Interacción triple longitud de brotes, madurez y período de crecimiento.

Table 4. Correlation between variables. Upper triangle- MP, lower triangle -YP.

Tabla 4. Correlación entre variables. Triángulo superior- MP, triángulo inferior -YP.

	Sprout length	Sprout length	Dry matter	Sprout number
Dry matter		0,2046	0,6622	0,1221
Sprout Number	0,1400		0,8487	0,5019

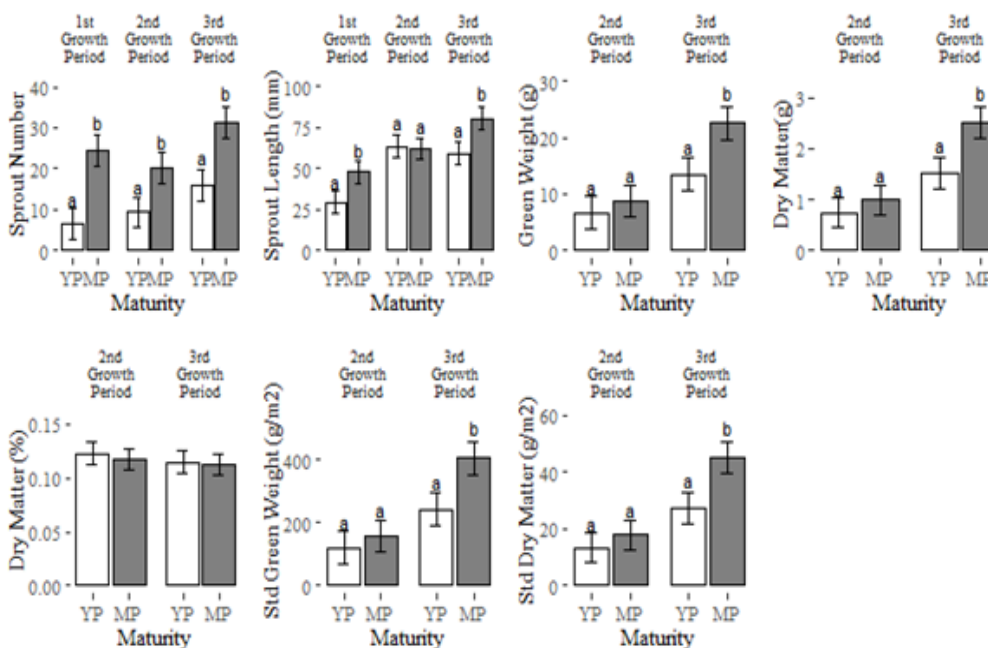


Figure 5. Interaction of maturity, green weight, dry weight per plant and standardized weight, with season and number of outbreaks of *Salicornia* (*Amerocornia* *magellanica*).

Figura 5. Interacción de madurez, peso verde, peso seco por planta y peso estandarizado, con estación y número de brotes de *Salicornia* (*Amerocornia* *magellanica*).

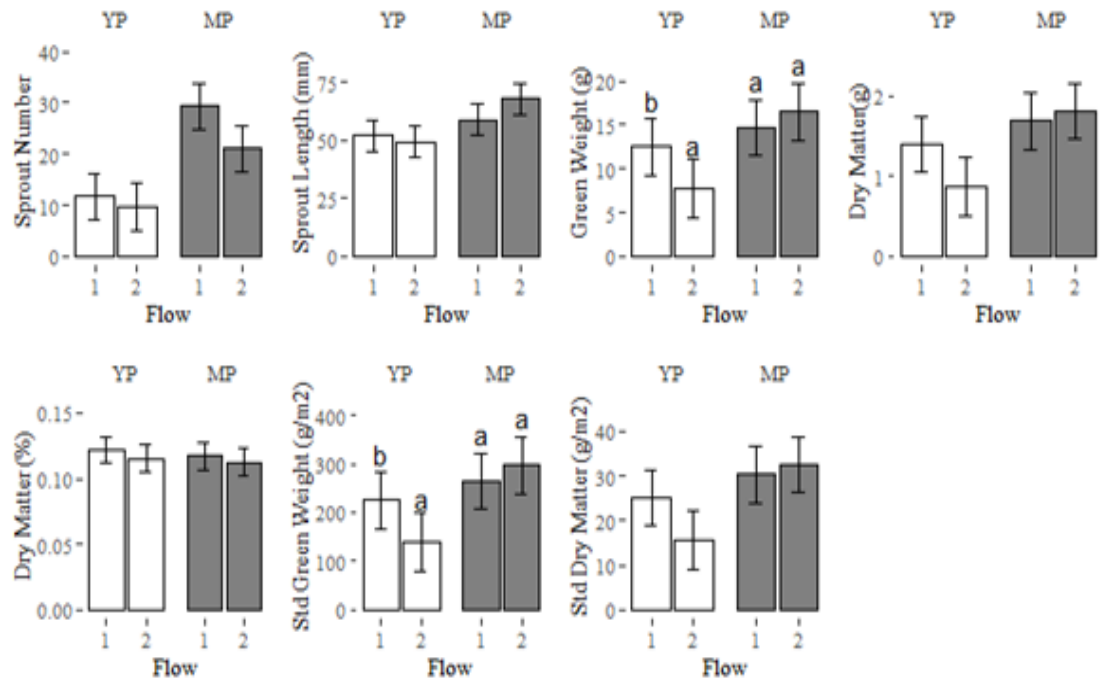


Figure 6. Flow and age interaction in *Salicornia (Amerocornia) magellanica*.
Figura 6. Interacción de flujo y edad en *Salicornia (Amerocornia) magellanica*.

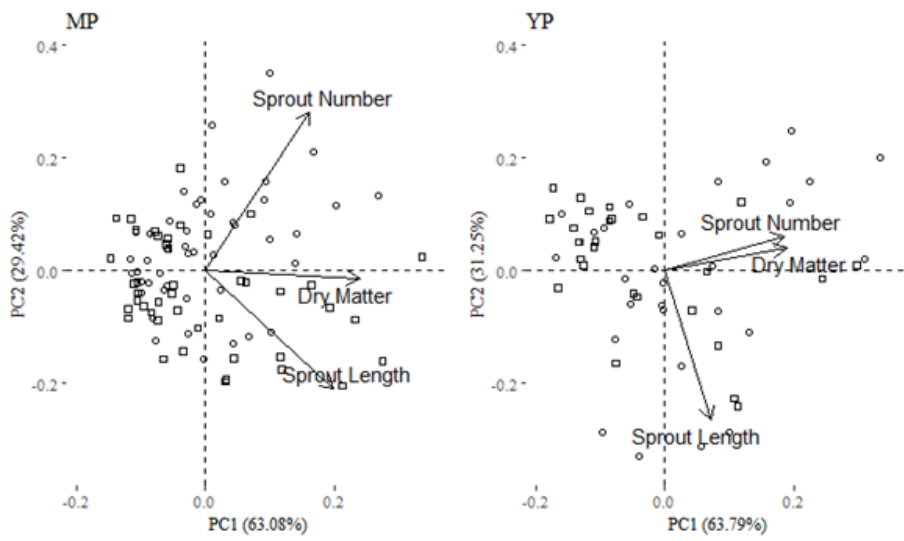


Figure 7. Graph of correlations between variables in *Salicornia (Amerocornia) magellanica*.
Figura 7. Gráfico de correlaciones entre variables en *Salicornia (Amerocornia) magellanica*.

Correlation Analysis

Analysis shows that in mature and young plants, variables length and number of shoots are poorly correlated. The dry weight is more correlated with the length of shoots in mature plants, instead, it is more correlated with the number of shoots in young plants. These results are supported by the correlation between variables (Table 5).

There is no clear pattern between risks, but it is possible to see that the variation between seasons is consistent. The plants increased the dry weight as the growth stages passed, which we can mention, according to the physiological aspects that are influenced by salinity in the production of dry matter and green matter.

Table 5. Simple ANOVA table, with Dilution as a factor F (p).

Tabla 5. Tabla ANOVA simple, con dilución como factor F (p).

Factor	Sprout Length	Sprout Number
Dilution	9,52 (<0,0001)	2,62 (0,0422)

Test Hydroponics Culture

The hydroponics test showed a greater survival of young plants (82 - 84%) between 11 to 20 g/L of seawater salinity (Figure 8, 9). The sprouts length had significant differences between freshwater (2 g/L) and the concentration of 25% seawater (11 g/L) and the sprouts number was significantly greater with dilution of 50% seawater (18 g/L). This test substantially improved the one carried out the previous

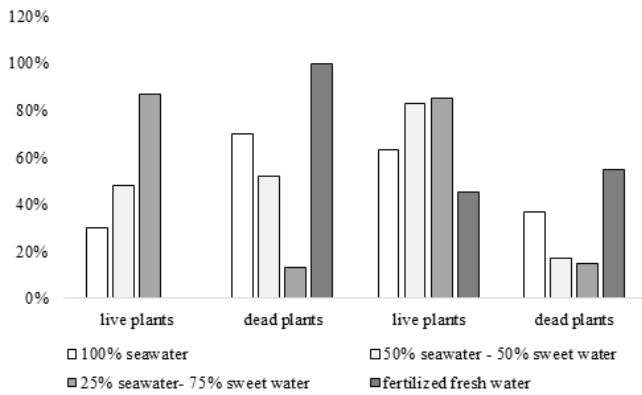


Figure 8. Survival of *Salicornia* (*Amerocornia*) *magellanica* plants in each season and for each dilutions of the hydroponics crop: a) 100% Seawater, b) 50% seawater and 50% fresh water, c) 25% seawater and 75% fresh water and d) Water tap with fertilizer.

Figura 8. Supervivencia de las plantas de *Salicornia* (*Amerocornia*) *magellanica* en porcentaje en cada estación y para cada dilución del cultivo hidropónico: a) 100% de agua de mar, b) 50% de agua de mar y 50% de agua dulce, c) 25% de agua de mar, 75% agua dulce y d) Grifo de agua con abono.

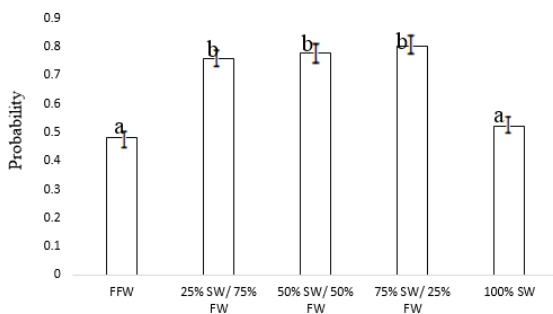


Figure 9. Statistical analysis of *Salicornia* seedlings survival, grown in hydroponics culture.

Figura 9. Análisis estadístico de la supervivencia de plántulas de *Salicornia* cultivadas en cultivo hidropónico.

year in greenhouse conditions, where the average survival of plants of the different salinities was approximately 40% (Figure 8, 9, 10).

This first experimental cultivation of *Salicornia* irrigated with seawater showed a significant increase in the number of outbreaks in plants with greater initial development (PM) and greater biomass production. Independent of the irrigation flow used and with water salinities between 11 and 20 g/L. Hasna *et al.* (2014) found that *Sarcocornia ambigua* (Michx) Alonso and Crespo (current *Salicornia ambigua*) plants defined as large (13 cm), brought to field cultivation, performed 3 to 4 times higher in growth parameters compared to 4 cm tach seedlings, initial end. Although a clear pattern between flows is not observed, young plants (YP) had greater green weight with the lowest flow, in mature plants they had significantly greater green and dry production during the third period of growth, regardless of the volume of seawater received. Ventura *et al.* (2011), found a similar results when working with seawater in marsh conditions.

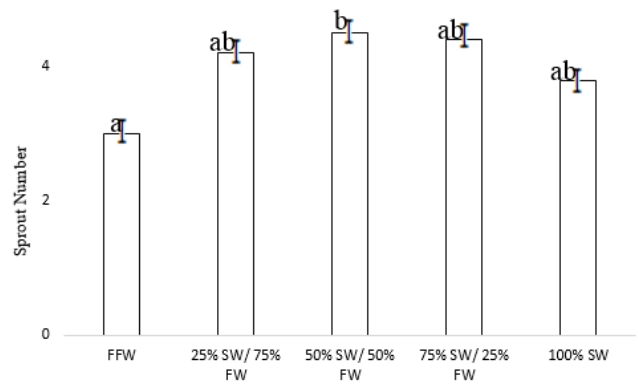


Figure 10. *Salicornia* length and number of shoots. Individual ANOVA of hydroponics plants. Significant differences results with $p < 0.05$.

Figura 10. Longitud de *Salicornia* y número de brotes. ANOVA individuales de plantas hidropónicas. Resultados de diferencias significativas con $p < 0.05$.

There is little background of *Salicornia* cultivation based on localized irrigation with seawater. The works done on halophytes refers to trials in fields on marine coasts or inland environments salinized, irrigated by furrows or saline waters flooding (López *et al.*, 2020; Rueda *et al.*, 2012; Costa *et al.*, 2006; Glenn *et al.*, 1984). The green weight production of 100 to 435 gm² in this trial is comparable to coastal Beagle Channel crops and furrow irrigation, which produced between 300 and 500 gm² in unprotected tunnel plants in the second culture year (Bianciotto *et al.*, 2017ab). There was an increase in production between the first and third harvest of 50 to 80% in both types of plants. In the case of mature plants (PM), irrigated with the highest flow and in young plants (YP), irrigated with the lowest flow. In general, mature plants have higher productivity in the third season, regardless of the flow of seawater received. The above considering maintaining soil moisture for each plant at field capacity (moist soil) which is a relevant aspect to for a good physiological performance of a plant (Fernández *et al.*, 2010).

The irrigation system used with timer and variable flow drippers (Variflow), with flow rates of 0.7 to 1.5 L/h, showed no obstructions to the water flow by the effect of salt accumulation. Other models using perforated hoses with fixed flow calibrated drippers generate frequent obstructions due to accumulation of salts in low-pressure irrigation and flows below 16 L/h, (Jayakumar *et al.*, 2014). The system also allows flexibility in the number of pots to be watered, allowing to add or remove spikes depending on the number of plants.

To facilitate the design of these small-scale agricultural systems using seawater, a linear mathematical model represented in an abacus for the cultivation of *Salicornia* is proposed. The water regime of each locality of Tierra del Fuego, the size of the pots, the number of plants and the irrigation with the necessary saline water are related, this results are in agree with Piirainen *et al.* (2017), Boscaiu and Vicente (2013) and Izzepi (2011).

In hydroponic cultivation, the optimal dilution of seawater for the best development of *Salicornia* varied

between 11-20 g/L, equivalent to a dilution of 25 - 50% of seawater, which produced the highest plant survival, length and number of shoots. Other works related to the genus *Salicornia* - *Sarcocornia* are defined as an appropriate salinity range of 18 to 35% g/L (Ayala and O'leary, 2003; Davy *et al.*, 2001; Harrouni *et al.*, 2003ab; Costa *et al.*, 2006). In this test, the dilution by rain does not exceed 20% of the total water received by the plants, so the irrigation water had a salinity level of 18-20 g/L regardless of the flow applied.

CONCLUSIONS

The achieved cultivation unit compatible with the production data, allows us to infer that from 36 pots of 3 Lm², it can be considered sufficient for home consumption. From the proposed abacus you can determine the volume of seawater needed in approximately 50-60 L per month, accessible transport in 6 L containers. The system ordered by time of irrigation and variable opening of the dripper reduced their clogging, minimizing the maintenance of the system. The design offers enough flexibility for different productive units.

A better production in green weight is possible to achieve considering an initial development of the seedlings from five to seven months before the definitive transplant.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES)-Finance Code 001 and the Brazilian Research Agency Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP2012/50083-7. We thank also the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their granting of scholarships to students of this work.

REFERENCES

- Arce, M. E., Bianciotto, O., Stronati, M.S., Yepes M.S., Blessio, A. and Aras, F.M. 2016. Agriculture and sheep production on Patagonian Sabkhas with *Sarcocornia neei*, irrigated with sea water (Chubut - Argentina). *Sabkha Ecosystems*: V: 275-285.
- Aarland, Rayn, Osvaldo, Castellanos-Hernandez, Araceli, Rodriguez-Sahagun, Gustavo Acevedo-Hernandez. 2020. Efecto del estrés salino sobre la morfología y fitoquímica de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) cultivado in vitro. *Biotecnia* Vol. 22 (3). DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1223>.
- Ayala, E and O'leary L.W. 2003. Growth and physiology of *Salicornia bigelovii* (Torr). at sub-optimal salinity. *Int: J Plant Sci* (1995); 156:197-205. In: H. Lieth (ed.), *Cash Crop Halophytes: Recent Studies*, (pp. 121-124). Task for Vegetation Science - 38. (pp. 59-70). © 2003 Springer Science+Business Media. Dordrecht. Kluwer Academic. (ISBN 978-90-481-6256-7).
- Beltrán-Burboa, C. E., Arce M. E., Bianciotto O., López Ahumada G. A., Vargas J. M., Hernández-Montiel L. G., Reyes-Pérez J. J., Nieto-Garibay A., Ruiz-Espinoza F. I., Ayala Alvarez F., Cisneros Almazán R., Wong Corral F. J., Borboa Flores J. and Rueda-Puente E. O. 2017. *Salicornia bigelovii* (Torr): Un sistema modelo para incorporarse como cultivo agrícola en zonas árido-desérticos. *Biotecnia - Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud* recuperado de: <http://biotecnia.unison.mx>. Vol. XIX(E3): 46-50. Sonora - México.
- Bianciotto, O., A. Blessio, L. Pinedo and Gea P. 2004. Efectos ambientales sobre el potencial forrajero y evaluación de la aptitud para la alimentación ganadera y humana, de una comunidad de *Salicornia* y *Puccinellia* en marismas de Tierra del Fuego. Informe final Consejo Federal de Inversiones (CFI) 400 pp.
- Bianciotto, O. 2006. "Los ambientes Naturales de la Estepa Fueguina". Editorial Dunken, Buenos Aires. 200 pp.
- Bianciotto, O., A. Blessio, L. Pinedo and Amin O. 2008. Agricultura con agua de mar en plantas nativas de tierra del Fuego. Informe final Proyectos Federales de Innovación productiva N° 8. 71 pp. Biblioteca CADIC- CONICET Ushuaia. PDF
- Bianciotto, O., Blessio, A. and Vater, G. 2014. Sección Agricultura con Agua de Mar: El Cultivo de Halófitas Nativas *Salicornia ambigua* Michx. (*Sarcocornia magellanica* Alfonso and Castro) y algunas hortalizas: In Vater G., Bianciotto O., Blessio A.; "Innovaciones Frutihortícolas en Regiones Australes: Invernaderos y Cultivos con Agua de Mar". Editorial Fueguina. Ushuaia 109-171
- Bianciotto, O., Alicia, Y., Blessio and Rueda-Puente, E. O. 2016. *Sarcocornia magellanica* (Phil.) M. A. Alonso and M. B. Crespo: an halophyte native of Tierra del Fuego (Argentina) irrigated with sea water for human consumption and sheep meat production. in *Sabka Ecosystem Vol. V: The Americas* (Ed.) M. Ajmal Khan, Benno Boër, Munir Sturk, Miguel Clüsener-Godt, Bilquees Gul, Siegm W. Breckler. Vol. 48: 225-236. in *Sabka Ecosystem Vol. V: The Americas* (Ed.) M. Ajmal Khan, Benno Boër, Munir Sturk, Miguel Clüsener-Godt, Bilquees Gul, Siegm W. Breckler. Springer. Vol. 48. ISBN 978-3-319-27091-3.
- Bianciotto, O. Aras F. Blessio, A. Arce, M. and Robledo, A. 2017a. *Sarcocornia magellanica* y *S. neei*. Primeras hortalizas patagónicas para consumo humano y producción de carne ovina diferenciada. Presentado en la Semana de las Ciencias - CONICET - UNTDF.
- Bianciotto, O. Aras, F. Blessio, A. Arce, M. and Robledo, A. 2017b. *Sarcocornia magellanica* y *S. neei*. Primeras hortalizas patagónicas para consumo humano y producción de carne ovina diferenciada. Informe final del proyecto CIUNPAT: *Sarcocornia* spp. para alimentación humana y producción de carne ovina en Patagonia. UNTDF - UNPSJB.
- Boscaiu, M. and Vicente, O. 2013. Halophytic crops for a salinising world. *Bulletin UASVM Horticulture*, 70 (1):1-9. Print ISSN 1843-5254; Electronic ISSN 1843-5394.
- Costa, Csb, Bonilla, Oh, Gesteira, Tvc, Pereira, Já, Sousa De, Fym, Leite, Ms, Carvalho, Cc, Andrade, Fj and Augusto-Ruiz, W. 2006. Producao de biomasa da halófito *Salicornia gaudichaudiana* irrigada com efluente de viveiro do camarão *Lipopenaeus vannamaeino* litoral do Ceara. Resumos expandidos do I Simposio sobre Biomás Costeiros e Marinhas, Salvador, Bahia.
- Davy, A. J., Bishop, G. F. M. and Costa, C. B. 2001. *Salicornia* L. (*Salicornia pusilla* J. Woods, *S. europea* L., *S. obscura* P.W. Ball and Tutin, *S. nitens* P.W. Ball and Tutin, *S. fragilis* P.W. Ball and Tutin, and *S. dolichostachya* Moos.). *Journal Ecology* 89, 681-707.

- Feng, L.T., Ji, Bin and Su, Bin. 2013. Economic value and exploiting approaches of sea asparagus, a seawater-irrigated vegetable. *Agricultural Sciences* 4: 40-44. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4236/as.2013.49081>
- Gleen, E.P. and O'leary. 1984. Relationship between salt accumulation and water content of dicotyledonous halophytes. *Plant. Cell Environ*; 7:253-61.
- Glenn, E. P., J. Brown, J. and O'leary J. W. 1998. Irrigating Crops with Seawater. *Scientific American Inc.* 76-81.
- Hasna, E., Karim, B.H., Iker, H., Jana, C.M., Chedly Abdely, Sergi Munne-Bosch. 2014. A comparative study of the early osmotic, ionic, redox and hormonal signaling response in leaves and roots of two halophytes and a glycophyte to salinity. *Planta* 240:1299-1317. DOI 10.1007/s00425-014-2154-7
- Harrouni, M.C., Daoud S. and Koyro H-W. 2003a. Effect of seawater irrigation on biomass Production and ion composition of seven halophytic species in Morocco. En: H. Lieth and Marina Mochtchenko (Ed.). *Cash Crop Halophytes: Recent Studies. Task for Vegetation Science*, 38 :59-70.
- Harrouni, M.C., Daoud S. and Koyro H-W. Lieth H. and Mochtchenko M. (Ed.) 2003b. Salinity tolerance of *Beta vulgaris* ssp. *maritima*. Part I. Biomass production and osmotic adjustment. En: *Cash Crop Halophytes: Recent Studies*, 41-49.
- Jayakumar, B., Rodrigo-Moreno, A. and Sergey, S. 2014. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* doi:10.1093/jxb/ert430
- López, A.J. González M.J. Lizárraga J.R., Díaz V.L. and Armenta, J.O. 2013. Temperatura del agua y su efecto en el funcionamiento hidráulico de cuatro modelos de goteros. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 94 - 108. ISSN Impreso 0120-0135
- Lieth, H. and Mochtchenko, M. (Ed.) 2003. *Cash Crop Halophytes: Recent Studies ten years after the Al Ain Meeting*. Springer – Science+Business Media, B.V. (ISBN 978-90-481-6256-7)
- López, P.A., Escárcega-Bobadilla, M., Mondragón-Camarillo, L., Hayano-Kanashiro, C., Varela-Romero, A., Vilchez-Vargas, A. y Kadiya, C.A. 2020. Evaluación del ciclo del nitrógeno en un suelo agrícola perturbado con compuestos Sal-fen de níquel y zinc. *Biotecnia Vol. 22 (3)*. DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1134>
- Kong, Y. and Zheng Y. 2014. Potential of Producing *Salicornia bigelovii* Hydroponically as a Vegetable at Moderate NaCl Salinity. *Hortsciencie* 49(9):1154-1157
- Koyro, H. and Werner, L. 2003. Study of potential cash crop halophytes by a quick check system. In: H. Lieth (ed.), *Cash Crop Halophytes: Recent Studies (121-124) Task for Vegetation Science* – 38: 59-70.
- Izzeppi, M. E. 2011. Efeitos da densidade de plantio na sobrevivência, desenvolvimento e produção de biomassa da halófito *Sarcocornia ambigua* (MICHX.) Alonso and Crespo. Teses de graduação em maestria em aquicultura Univ. Fed. O Rio Grande – FURG (R. Grande do Sul – Brasil).
- Piirainen, M. Liebisch, O. and Kadereit, G. 2017. Phylogeny, Biogeography, systematics and taxonomy of Salicornioideae (Amaranthaceae / Chenopodiaceae) – A cosmopolitan, highly specialized hygrohalophyte lineage dating back to the Oligocene. *Taxon* 66(1): 24-34
- Fernández, G.R., Ruela, M. Ma., Milla, M.M., García, B.J. and Oyonarte, G. 2010. Manual de riego para agricultores. Módulo 4. Riego Localizado. Autores: Serie (Agricultura: formación). 231p. I.S.B.N: 84-8474-135-4
- Rebolloza, Hernández H., Cervantes, A. Y., Broa, R.E., Bahena, D. G. and Olvera, V. 2020. Fenotipo y selección de líneas S1 segregantes de maíz tolerantes a estrés hídrico. *Biotecnia* 22 (3). DOI: <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i3.1130>
- Rueda, P.E., López, E. J. and Huez López M. A. 2012. Las Halófitas en la Agricultura de Zonas Áridas. Editorial Academia Española, 14 pp.
- Salazar, M., Mendes, S. Lopes, M. Diogo, A. Santos, E. Pacheco, J. and Marques, D. 2014. Growing *Salicornia* for human consumption, in Natural Reserve RNCSMVRSA. 2014. Algarve, Portugal. Putting halophytes to work from genes to Ecosystems cost action FAO 901. Final meeting Coimbra I Portugal. 9th and 10 h. Abril (Book of Abstracts)
- Ventura, Y. Wuddineh, W.A., Myrzabayeva, M. Alikulov, Z.; Khozin-Golberg, I. Shpigel, M. Samocho, T. M. and Sagi, M. 2011. Effects of seawater concentration on the productivity and nutritional value of annual *Salicornia* and perennial *Sarcocornia* halophytes as leafy vegetable crops. *Scientia Horticulturae* 128: 189-196. Doi:10.1016/j.scienta.2011.02.001.

Efecto del periodo seco en cabras bajo condiciones de pastoreo, en el volumen y cantidad de compuestos lácteos subsecuente

Effect of dry-off period in goats under grazing conditions, on milk production and compounds quantity

Ricardo Avilés Ruíz^{1,2}, José Alberto Delgadillo Sánchez¹, José Alfredo Flores¹, Manuel de Jesús Flores Nájera³, Alexis Adrián Vargas Cruz¹, Oscar Barrón Bravo², Andrés Sánchez Hernández¹, Horacio Hernández Hernández^{1*}

¹ Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Posgrado en Ciencias Agrarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Periférico Raúl López Sánchez. C.P. 27054. Torreón, Coahuila, México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Las Huastecas, Villa Cuauhtémoc carretera Tampico Mante kilómetro 55. C.P. 89610. Altamira, Tamaulipas, México.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental La Laguna, Matamoros, Boulevard José Santos Valdez. C.P. 27440. Matamoros, Coahuila, México.

RESUMEN

El objetivo del presente fue determinar si el practicar el periodo seco en cabras bajo condiciones de pastoreo incrementa la producción láctea y la cantidad de los componentes químicos de la leche. En el grupo de cabras sin periodo seco los animales se mantuvieron diariamente en ordeño manual hasta la ocurrencia del parto (SPS; n = 9). En las cabras del grupo con periodo seco se practicó el secado al suspender el ordeño manual desde 50 días antes del parto (CPS; n = 11). Se utilizó un diseño factorial con un modelo lineal de efectos fijos para evaluar la producción de leche y la cantidad de sus componentes en respuesta al tratamiento, el factor tiempo y la interacción tiempo x tratamiento. Existió un efecto del tratamiento sobre la producción de leche durante la lactancia, por lo que ésta fue mayor para el grupo CPS que para el grupo SPS (P<0.001). De igual manera la cantidad de componentes de la leche mostró un efecto significativo del tratamiento (P<0.001). Se concluye que en cabras lactantes mantenidas en condiciones de pastoreo el practicar el periodo seco promueve una mayor producción de leche en la subsiguiente lactancia y por ello también una mayor cantidad de sus contenidos.

Palabras clave: Periodo seco, Cabras, Lactancia, producción de leche, pastoreo.

ABSTRAC

The objective of the present work was to investigate if the practice of a dry-off period in goats maintained under grazing conditions, increases milk yield and therefore the quantity of its compounds. In goats without dry-off, females were hand milked until parturition (SPS; n = 9). Hand milking of goats from dry-off period was stopped 50 days prior occurrence of parturition (CPS; n = 11). We used a factorial design with a lineal model with fixed effects to compare milk yield and quantity of its main compounds, in response to the treatment, time, and time x treatment interaction. There was a treatment effect on milk yield during lactation, with higher values in CPS group than SPS group (P<0.001). In the same way, the quantity of milk compounds was influenced

by the treatment (P<0.001). In conclusion, the practice of the dry period in goats under grazing conditions, increase milk production during subsequent lactation and therefore the quantity of its components.

Keywords: Dry-off period, goats, lactation, milk yield, grazing.

INTRODUCCIÓN

De manera global, la mayoría de los sistemas de pastoreo extensivos caprinos están situados en zonas áridas o semiáridas (Albenzio *et al.*, 2016). En México, existen tres regiones que practican la caprinocultura (noreste, centro y sureste) y esta actividad proporciona los ingresos a los productores en estas regiones (Montaldo *et al.*, 2010). Sin embargo, muchas de las unidades de producción se caracterizan por tener un bajo nivel socioeconómico, escasas de recursos naturales como el agua, y los animales son mantenidos en una vegetación nativa que presenta variaciones en cantidad y calidad nutricional a lo largo del año (Baraza *et al.*, 2008). La Comarca Lagunera ubicada en la región noreste de México, posee un inventario poblacional de 416,820 caprinos y una producción de leche anual de 58,964,000 litros (SIAP, 2017).

En esta región de manera natural, las hembras adultas son preñadas en el mes de junio-julio, cuando los machos inician su periodo de actividad sexual. Una vez que las cabras son preñadas se desarrolla la gestación sin que el productor practique el periodo seco hacia el final de la gestación en las hembras y la mayoría de ellas presenten un secado natural paulatino (Escareño *et al.*, 2011). Sin embargo, en rumiantes mantenidos en un sistema intensivo es bien conocido que cuando se practica el secado, ello resulta en una mayor producción de leche en la lactancia siguiente (Caja *et al.*, 2006). El secado, es el periodo en el que las células alveolares dañadas o senescentes del tejido mamario son remplazadas para asegurar una producción de leche eficientemente en el periodo lactacional subsecuente (Capuco *et al.*, 1997). Por ello, en cabras con un potencial lechero elevado y a las que se les practicó el periodo seco de 50 días produjeron más leche en la lactancia subsecuente que en las cabras que no se les aplicó el secado (Salama *et al.*, 2005). Incluso, se ha demos-

*Autor para correspondencia: Horacio Hernández Hernández
Correo electrónico: hernandezhoracio@outlook.com

trado que en cabras lecheras mantenidas bajo un sistema semi-intensivo, que con solo 27 días de secado es suficiente para mejorar la calidad del calostro y leche (Caja *et al.*, 2006).

Hasta hoy, existe escasa información del efecto que tiene el practicar el periodo seco sobre la producción de leche en la lactancia subsecuente en animales mantenidos bajo condiciones de pastoreo. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si el practicar el periodo seco en cabras bajo condiciones de pastoreo incrementa la producción y por consecuencia la cantidad de los componentes químicos de la leche.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales reportados en el artículo actual estaban de acuerdo con la guía Investigación en Animales: Reportes de Experimentos en Vivo (ARRIVE; Kilkenny *et al.*, 2010) y con la Norma Oficial Mexicana para las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999; Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA, 2001)).

Localización del estudio

El estudio se realizó en la parte subtropical norte de México, en la región de la Comarca Lagunera (Estado de Coahuila; latitud 26 ° N; 1100 msnm). Las temperaturas máximas y mínimas promedio registradas durante el estudio fueron 24.6 ° C y 6.0 ° C, respectivamente.

Animales, condiciones de manejo y diseño experimental

En el presente estudio se utilizaron 20 cabras locales múltiparas encastadas (*Capra hircus*). Esta cabras se derivan de las razas española Granadina, Murciana y Malagueña, con cruza de las razas Alpina, Saanen y Anglo-Nubian (Duarte *et al.*, 2008). Todas las cabras se encontraban bajo un sistema de pastoreo extensivo. Éstas fueron pastoreadas diariamente de 10:00 a 13:00 horas y de 15:00 a 18:00 horas y permanecían en corrales durante la noche. Las cabras se alimentaron de la vegetación nativa y se complementaron con 0.2 kg de concentrado comercial el cual contenía 18% de PC (Generaleche, Purina®, Irapuato, México). Aproximadamente a 50 días previos a la fecha promedio del parto las cabras se asignaron de manera aleatoria a 1 de 2 grupos. Una vez conformados los grupos, no existió diferencia entre grupos en el número de fetos detectados por ultrasonografía transrectal, ni en la producción de leche previa, ni en la condición corporal. En el grupo de cabras sin periodo seco los animales se mantuvieron diariamente en ordeño manual hasta la ocurrencia del parto (SPS; n = 9). En cambio, las cabras del grupo con periodo seco se practicó el secado al suspender el ordeño manual hasta el parto (CPS; n = 11). En la última ordeña a estas cabras se les administró vía intramamaria 5 mL de un desecador comercial (Cepravin Intervet® Kenilworth, USA) para prevenir infecciones.

La fecha promedio \pm error estándar del promedio (\pm SEM) del parto para todas las cabras fue el 31 de agosto

(\pm 1.0 día). Las crías se mantuvieron con su respectiva madre durante los primeros 21 días post-parto. Ellas fueron amamantadas libremente desde que sus madres regresaban del pastoreo hasta la mañana siguiente. Después del retiro definitivo de las crías, las cabras se ordeñaron una vez al día (a las 07:00 horas) hasta el final del experimento.

Variables evaluadas

Estimación de la producción de leche durante el parto

Durante este periodo y solo en las cabras del grupo SPS se midió de manera semanal la cantidad de leche obtenida en 24 h. La leche obtenida en el ordeño se pesó en una báscula electrónica con una capacidad de 40 kg y una precisión de 0.005 kg y esta cantidad fue registrada en un formato.

Estimación de la producción de leche durante el periodo de amamantamiento

La producción de leche durante el periodo de amamantamiento para ambos grupos fue estimada por el método de la diferencia de peso de las crías antes y después de un amamantamiento controlado (Ricordeau *et al.*, 1960). Éste consistió en el vaciado completo de la ubre a las 19:00 horas y la (s) cría (s) se separaron de su madre toda la noche. Al día siguiente a las 07:00 horas se pesó a la cría vacía, después de esto, se le permitió un amamantamiento controlado de 3 min y la (s) cría (s) nuevamente fueron pesadas. Por diferencia de pesos de la (s) cría (s) se obtuvo la producción láctea de la madre. Finalmente se administró 2 UI de oxitocina exógena (OT; Oxilac-Proquivet, Guadalajara, México) para extraer la leche residual, la cual se sumó a la leche obtenida por la diferencia de pesos de la cría.

Estimación de la producción de leche durante el periodo de ordeño

Una vez que las crías fueron separadas definitivamente de sus madres, la producción de leche durante el periodo de ordeño fue evaluada cada semana durante los primeros 2.5 meses de lactación. Así, en cada ocasión se registró la cantidad de leche obtenida en la ordeña manual. Al final del ordeño, se administró por vía IV de la yugular 2 UI de OT exógena, e inmediatamente se procedió a ordeñar para extraer la leche residual, la cual se sumó a la leche obtenida en el ordeño.

Cantidad obtenida de los componentes de la leche

En cada ocasión cuando la producción de leche fue estimada, se tomó una muestra de leche de 20 mL de la ordeña manual la cual se recolectó en bolsas plásticas estériles etiquetadas, manteniéndolas en refrigeración y fueron transportadas a laboratorio. Utilizando un equipo automatizado (Milkoscope Expert®, Scope Electric. Ratisbona, Alemania), se realizó el análisis de las muestras de leche y se obtuvieron los porcentajes de sólidos totales, grasa, lactosa y proteína. Para calcular en gramos/día los porcentajes de estos componentes se utilizó una regla de tres simple directa, considerando la producción de leche de cada cabra como el 100%.

Condición corporal (CC)

La CC se midió cada semana durante todo el estudio mediante la técnica descrita por Walkden-Brown *et al.* (1997), la cual consiste en estimar por palpación la cantidad de tejido muscular y graso de la región lumbar del animal. Esta metodología, utiliza una escala de valores que van del 1 a 4 puntos con una precisión de 0.5.

Mediciones de la ubre

En las cabras de ambos grupos las mediciones externas de la ubre (vacía en el caso de las del grupo SPS) se registraron 1 semana antes de la fecha promedio esperada del parto. Se utilizó la técnica descrita por Emediato *et al.* (2008) para medir el ancho, profundidad y circunferencia de la ubre.

Cálculo de variables y análisis estadístico

Con los datos individuales de producción de leche de cada cabra obtenidos cada semana en ambos periodos (amamantamiento y ordeña) se calculó el promedio total durante el tiempo de estudio. Con cada uno de estos datos se calculó el promedio ponderado de cada grupo y este se comparó con una *t* de student independiente. Se utilizó un diseño factorial con un modelo lineal de efectos fijos para evaluar la producción y los compuestos químicos de la leche en respuesta al factor tratamiento (dos niveles: SPS y CPS), el factor tiempo (14 niveles, correspondientes a las semanas de medición durante la segunda lactancia del experimento) y la interacción tiempo \times tratamiento en el periodo amamantamiento y ordeña.

El modelo usado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{tratamiento}_i + \text{tiempo}_j + \text{tratamiento} \times \text{tiempo}_{ij} + e_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} es el *ijk*ésima observación de la variable medida (producción de leche, y componentes químicos), μ es la media general, tratamiento_i es el efecto del *i*ésimo tratamiento, tiempo_j es el efecto de la *j*ésima semana de medición,

$\text{tratamiento} \times \text{tiempo}_{ij}$ es la interacción entre tratamiento y tiempo, y e_{ijk} representa el error aleatorio asociado a cada observación.

Los datos obtenidos de cada medición que fueron utilizados para cada variable como las mediciones de la ubre, el peso de las crías y su tasa de crecimiento se compararon entre grupos con una *t* de student independiente. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico Statgraphics plus versión (Statpoint, Herndon, VA). El nivel de significancia se estableció a $P < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se observa que la producción de leche varió a través del tiempo para ambos grupos ($P < 0.001$). Existió un efecto del tratamiento sobre la producción de leche durante el periodo de amamantamiento y de ordeña, por lo que ésta fue mayor para el grupo CPS que para el

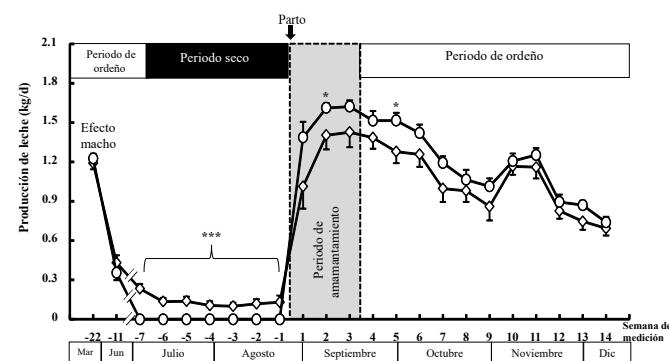


Figure 1: Least squares means (\pm SE) of milk production of the grazing goats group that underwent dry period (DP group; \circ ; $n = 11$), and from the group without dry period (NDP group; \diamond ; $n = 9$). Significant differences between treatments are indicated by asterisks (* $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$). **Figura 1.** Medias de mínimos cuadrados (\pm EE) de producción de leche del grupo de cabras en pastoreo a las que se les practicó periodo seco (grupo CPS; \circ ; $n = 11$), y del grupo que no se practicó el periodo seco (grupo SPS; \diamond ; $n = 9$). Diferencias significativas entre tratamientos en cada semana son indicados por los asteriscos (* $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$).

Tabla 1. Valores medios (\pm EE) de variables de producción, dimensiones de la ubre y parámetros de crías de las cabras del grupo con período seco (CPS, $n = 11$), y sin período seco (SPS, $n = 9$).

Table 1. Means (\pm SE) of production variables, udder dimensions and calf parameters of dry period group goats (DP, $n=11$) and without dry period (NDP, $n=9$).

Grupos	Producción y componentes químicos					†Mediciones de la ubre			Parámetros de las cría	
	Producción de Leche (kg)	Grasa (g)	Proteína (g)	Lactosa (g)	Sólidos Totales (g)	Profundidad (cm)	Circunferencia (cm)	Ancho (cm)	Peso al Nacimiento (kg)	‡Tasa de crecimiento (g)
SPS (n=9)	1.08 \pm 0.06	46 \pm 3	37 \pm 2	56 \pm 3	101 \pm 6	17.5 \pm 0.5	38.2 \pm 1.9	11.8 \pm 0.6	3.21 \pm 0.18 (n = 13)	167 \pm 10 (n = 13)
CPS (n = 11)	1.23 \pm 0.02	58 \pm 3	43 \pm 1	64 \pm 2	116 \pm 3	19.9 \pm 0.7	43.3 \pm 2.2	13.2 \pm 0.5	3.58 \pm 0.11 (n = 18)	179 \pm 15 (n = 18)
% de pérdida	12.19	20.69	13.95	12.50	12.93	12.06	11.77	10.6	10.33	6.7
<i>P</i> valor	0.041	0.020	0.037	0.035	0.041	0.025	0.120	0.130	0.095	0.500

Nota: † Las mediciones de ubre se llevaron a cabo una semana previa a la fecha promedio del parto.

‡ La tasa de crecimiento de las crías de calculó a los 21 días de vida.

grupo SPS ($P < 0.001$). Los análisis estadísticos demostraron que la interacción tratamiento \times tiempo no fue significativa ($P > 0.05$). Los resultados presentados en la Tabla 1, refuerzan lo anterior, ya que se observan hasta el periodo evaluado porcentajes de pérdidas tanto para la producción como para sus componentes químicos. Los presentes resultados confirman que en cabras mantenidas en pastoreo extensivo el inducir un periodo de descanso de la ubre o periodo seco repercute de manera importante sobre la producción de leche en la lactancia subsecuente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Caja *et al.* (2006) quienes observaron que en las cabras con alto potencial lechero mantenidas en un sistema semi-intensivo y a las que se les omitió practicar un periodo de secado produjeron menos leche que a las que se les practicó dicho periodo seco. Además, este mismo equipo de investigadores demostró que en la cabra Murciano-Granadina que de manera espontánea se secaron por solo 27 días, su producción de leche subsecuente no difirió de aquellas que fueron secadas por 50 días.

La producción por día de los diferentes contenidos evaluados en la leche mostró variaciones a través del tiempo ($P < 0.001$), como se muestra en la Figura 2. En ella, además se observa que la cantidad por día en todos los componentes fue mayor en las cabras del grupo CPS que en las del grupo SPS, sobre todo en el periodo que permanecieron las crías con sus madres. En efecto, el modelo estadístico indicó en los cuatro componentes un efecto significativo del tratamiento ($P < 0.001$). Estos resultados aportan información novedosa en los rumiantes en general. Efectivamente, no se tiene literatura acerca de cómo los componentes químicos de la leche se disminuyen por efecto de la práctica de no del secado, sobre todo en la lactancia temprana. Entre los pocos estudios en cabras, Caja *et al.* (2006), observaron que los componentes del calostro disminuyen por efecto de la práctica del no secado, que en aquellas que se sometieron al secado. En las vacas Holstein italianas, Mantovani *et al.* (2010) no encontró diferencia en el porcentaje de grasa y proteína contenida en la leche de vacas que fueron secadas por 50 días y de aquellas que no fueron secadas. Sin embargo, al igual que en el presente estudio, como la producción de leche fue mayor en las vacas que fueron secadas, ello resultaría en mayor producción en gramos/día de esos componentes de la leche. Sin embargo, estudios en los cuales se establecieron diferentes duraciones del periodo seco en vacas, indicaron que a menor tiempo de secado se obtienen menores cantidades de los componentes de la leche que a mayor tiempo de secado (Sorensen y Enevoldsen, 1991).

Las mediciones de la profundidad, la circunferencia y el ancho de la ubre evaluadas a una semana antes del parto se muestran en la Tabla 1. En esta tabla es claro el efecto que ejerce el ordeño continuo (grupo SPS) sobre esas mediciones, ya que todas fueron mayores en el grupo CPS; sin embargo, solo la profundidad de la ubre alcanzó significancia ($P < 0.05$). Posiblemente este crecimiento de la ubre hacia el final del periodo seco en las cabras del grupo CPS es reflejo de un proceso de hipertrofia en el parénquima mamario (Turner, 1965).

La tasa de crecimiento de las crías del grupo CPS fue mayor que el registrado en las crías del grupo SPS, aunque no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$; Tabla 1). Es probable que como se ha reportado previamente (García y González *et al.*, 2017) el peso de las crías está correlacionado positivamente con el nivel de producción láctea de las madres. En otras palabras, es posible que como las madres del grupo CPS produjeron mayor cantidad de leche entonces sus crías fueron más pesadas que en las del grupo SPS.

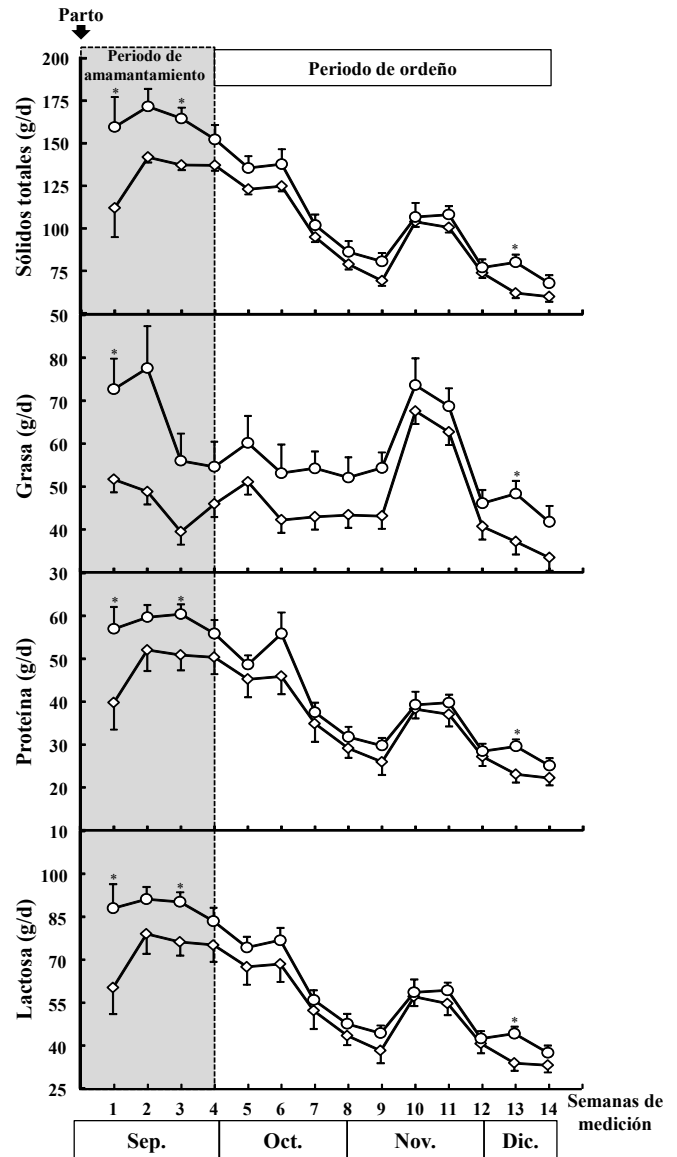


Figure 2. Least squares means (\pm SE) of total solids, fat, protein and lactose content of the grazing goats group that underwent dry period (DP group; \circ ; $n = 11$), and from the group without dry period group (NDP group; \diamond ; $n = 9$). Significant differences between treatments are indicated by asterisks ($*P < 0.05$).

Figura 2. Medias de mínimos cuadrados (\pm EE) del contenido de sólidos totales, grasa, proteína y lactosa de cabras en pastoreo a las que se les practicó periodo seco (grupo CPS; \circ ; $n = 11$), y cabras sin periodo seco (grupo SPS; \diamond ; $n = 9$). Diferencias significativas entre tratamientos en cada semana son indicados por asteriscos ($*P < 0.05$).

La CC en las cabras de ambos grupos en diferentes periodos del estudio se muestra en la Figura 3. No se encontró un efecto del tratamiento ($P>0.05$) sobre esta variable en ningún momento del estudio. Sin embargo, en ambos grupos esta variable mostró variaciones a través del tiempo ($P<0.001$). Aunque en el presente estudio la CC no fue afectada por el tratamiento, en vacas lecheras se ha reportado que las hembras que ganan CC durante el periodo seco producen más leche, grasa y proteína que aquellas que no ganan CC (Chebel *et al.*, 2018).

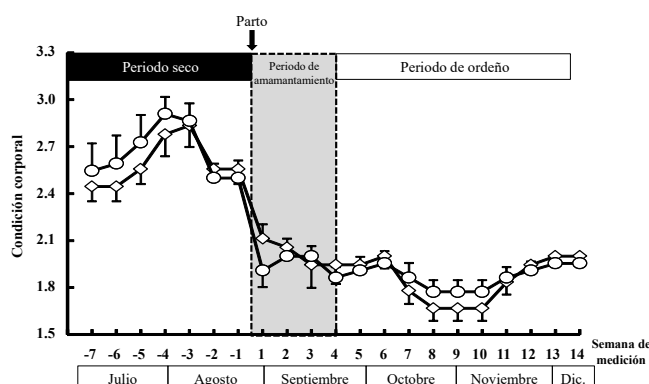


Figure 3: Least squares means (\pm SE) of body condition score of the grazing goats group that underwent dry period (DP group; \circ ; $n = 11$), and from the group without dry period (NDP group; \diamond ; $n = 9$).

Figura 3. Medias de mínimos cuadrados (\pm SEM) de la condición corporal de cabras en pastoreo a las que se les practicó periodo seco (grupo CPS; \circ ; $n = 11$), y cabras sin periodo seco (grupo SPS; \diamond ; $n = 9$).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten concluir que, en las cabras mantenidas bajo un sistema extensivo, el practicar un periodo de secado de 50 días promueve de manera importante una mayor producción láctea tanto en el periodo de amamantamiento como durante el periodo de ordeño. Debido a este incremento, también se obtiene una mayor cantidad diaria de los principales componentes de la leche. Sería importante determinar, como se ha hecho en cabras con mayor potencial lechero, si este periodo de secado pueda reducirse, sin comprometer el desempeño de la lactancia subsecuente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Prof. Jesús Abasta por la facilitación de los animales utilizados en el presente estudio. Asimismo, agradecen a la Lic. Dolores López Magaña, a Esther Peña y a todos los Investigadores y alumnos del CIRCA-UAAAN y del Posgrado en Ciencias Agrarias por su apoyo técnico para la realización del presente estudio.

R. Avilés fue apoyado por una beca CONACyT durante sus estudios de Doctorado. La investigación fue realizada como parte de las actividades del Laboratorio Internacional Asociado (LIA CABRAA) entre México (UAAAN-CIRCA) y Francia (INRA-PRC).

REFERENCIAS

- Albenzio, M., Santillo, A., Avondo, M., Nudda, A., Chessa, S., Pirisi, A. and Banni, S. 2016. Nutritional properties of small ruminant food products and their role in human health. *Small Ruminant Research*. 135:3-12.
- Baraza, E., Ángeles, S., García, A. y Valiente, B.A. 2008. Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el Valle de Tehuacán, México. *Interciencia*. 33:12-15.
- Caja, G., Salama, A.A.K. and Such, X. 2006. Omitting the dry-off period negatively affects colostrum and milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 89:4220-4228.
- Capuco, A.V., Akers, R.M. and Smith, J.J. 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acids and histology. *Journal of Dairy Science*. 80:477-487.
- Chebel, R.C., Mendonça, L.G.D. and Baruselli, P.S. 2018. Association between body condition score change during the dry period and postpartum health and performance. *Journal of Dairy Science*. 101:4595-4614.
- Duarte, G., Flores, J.A., Malpoux, B. and Delgadillo, J.A. 2008. Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domestic Animal Endocrinology*. 35:362-370.
- Emediato, R.M.R., Siqueira, E.R., Stradiotto, M.M., Maesta, S.A. and Fernández, S. 2008. Relationship between udder measurements and milk yield in Bergamasca in Brazil. *Small Ruminant Research*. 75:232-235.
- Escareño, L., Wurzinger, M., Pastor, F., Salinas, H., Solkner, J. y Iñiguez, L. 2011. La cabra y los sistemas de producción caprina de los pequeños productores de la Comarca Lagunera, en el norte de México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 17:235-246.
- García y González, E., Flores, J.A., Delgadillo, J.A., González-Quirino, T., Fernández, I.G., Terrazas, A. and Hernández, H. 2017. Early nursing behaviour in ungulate mothers with hider offspring (*Capra hircus*): Correlations between milk yield and kid weight. *Small Ruminant Research*. 151:59-65.
- Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. and Altman, D.G. 2010. Animal research: reporting in vivo. *Public Library of Science. Biology*. 8, e1000412.
- Mantovani, R., Marinelli, L., Bailoni, L., Gabai, G. and Bittante G. 2010. Omission of dry period and effects on the subsequent lactation curve and on milk quality around calving in Italian Holstein cows. *Italian Journal of Animal Science*. 9:110-118.
- Montaldo, H.H., Torres-Hernández, G. and Valencia-Posadas, M. 2010. Goat breeding research in México. *Small Ruminant Research*. 89:155-163.
- Ricordeau, G., Boccard, R. and Denamur, R. 1960. Mesure de la production laiti re des brebis pendant la période d'allaitement. *Annales de Zootechnie*. 9:97-120.
- SAGARPA. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. June 18th, 2001. Ciudad de México, México.
- Salama, A.A.L., Caja, G., Such, X., Cassals, R. and Albanell, E. 2005. Effect of pregnancy and extended lactation on milk production in dairy goats milked once daily. *Journal of Dairy Science*. 88:3894-3904.
- SIAP. 2017: Población caprina en México 2008-2017. Secretaría de agricultura, ganadería desarrollo rural pesca y alimentación.

- Ciudad de México, México.<http://www.siap.gob.mx/opt/poblagand/caprino.pdf> (12/05/2017).
- Sørensen, J.T. and Enevoldsen, C. 1991. Effect of dry period length on milk production in subsequent lactation. *Journal of Dairy Science*. 79:1277-1283.
- Turner, C.W. 1965. What cause high production? Boletín 836. University of Missouri. Agricultural Experiment Station.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Scaramuzzi, R.J, Martin, G.B. and Blackberry, M.A. 1997. Seasonality in male Australian cashmere goats: long term effects of castration and testosterone or oestradiol treatment on changes in LH, FSH, and prolactin concentrations, and body growth. *Small Ruminant Research*. 26:239-252.



Efecto de termosonicación y pasteurización sobre propiedades fisicoquímicas, microbiológicas y nutracéuticas en bebidas de maíz

Effect of thermosonication and pasteurization on physicochemical, microbiological and nutraceutical properties in maize beverages

Pablo Alan Rodríguez-Salinas¹, Vania Urías-Orona², Dolores Muy-Rangel³, José Basilio-Heredia³, Angela Suarez-Jacobo⁴, Juan Gabriel Báez-González⁵, Francisco Zavala-García¹, Guillermo Niño-Medina^{1*}

* Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. Francisco Villa S/N, Col. Ex Hacienda El Canadá, C.P. 66050. General Escobedo, Nuevo León, México.

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Salud pública y Nutrición. Av. Dr. Eduardo Aguirre Pequeño y Yuridia, Col. Mitras Centro, C.P. 64460. Monterrey, Nuevo León, México.

³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C., Coordinación Culiacán. Carretera Culiacán a El Dorado km 5.5, C.P. 80110. Col. Campo el Diez, Culiacán, Sinaloa, México.

⁴ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), A.C., Unidad Noreste. Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT), C.P. 66629. Apodaca, Nuevo León, México.

⁵ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Av. Universidad S/N, C.P. 66451 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

RESUMEN

El maíz es utilizado como una de las principales fuentes en la nutrición humana. Gracias a su aporte nutrimental se utiliza en la preparación de bebidas artesanales o tradicionales. Debido a que existe poca información sobre formulación de bebidas y su comportamiento frente a tratamientos emergentes o tradicionales de conservación, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un tratamiento de conservación con termosonicación y un tratamiento tradicional como la pasteurización sobre color, calidad microbiológica, parámetros fisicoquímicos y propiedades nutracéuticas de bebidas de maíz blanco y morado. Los resultados en las bebidas mostraron modificaciones de color y parámetros fisicoquímicos (pH, acidez titulable y sólidos totales) y contenido de microorganismos. No se observaron diferencias en los compuestos fenólicos (95.23-128.29 mg EAG/L), flavonoides (43.41-72.30 mg EC/L) y antocianinas (0.89-1.20 mg EC3G/L). La bebida de maíz blanco presentó mayor contenido de ácido ferúlico (45.77-48.90 mg/L), mientras que la de maíz morado presentó mayores valores de ácido clorogénico (37.14-39.58 mg/L), cafeico (33.26 mg/L) y capacidad antioxidante por DPPH (311.48-384.78 $\mu\text{mol ET/L}$) y FRAP (1093.33-1566.67 $\mu\text{mol ET/L}$). En conclusión, la pasteurización en bebidas de maíz favoreció el incremento en la capacidad antioxidante y una mayor eficiencia en la calidad microbiológica.

Palabras clave: Calidad microbiológica, compuestos fenólicos, termosonicación, pasteurización, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

Maize is one of the main sources in human nutrition. Thanks to its nutritional contribution, it is used in the crafted or traditional beverages preparation. Since there is little information on the beverage formulation and their behavior in emerging or traditional preservation treatments, the

objective of this work was to evaluate the effect of thermosonication as a preservation treatment, and a pasteurization traditional treatment, on color, microbiological quality, physicochemical parameters and nutraceutical properties of white and purple maize beverages. The results show changes in color and physicochemical parameters (pH, titratable acidity and total solids) and content of microorganisms. No differences were observed in phenolic compounds (95.23-128.29 mg EAG/L), flavonoids (43.41-72.30 mg EC/L) and anthocyanins (0.89-1.20 mg EC3G/L). The white maize beverage had a higher ferulic acid content (45.77-48.90 mg / L), while the purple maize showed higher chlorogenic acid values (37.14-39.58 mg/L), caffeic (33.26 mg/L) and antioxidant capacity of DPPH (311.48-384.78 $\mu\text{mol ET/L}$) and FRAP (1093.33-1566.67 $\mu\text{mol ET/L}$). In conclusion, pasteurization in maize beverages favored the increase of the antioxidant capacity and a greater efficiency in microbiological quality.

Keywords: Microbiological quality, phenolic compounds, thermosonication, pasteurization, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es utilizado como una fuente de alimentación en el mundo (Ranum *et al.*, 2014). Los cereales como el maíz poseen alto contenido de compuestos fenólicos. Estos compuestos pueden encontrarse de forma libre o ligada, un ejemplo de esto es el ácido ferúlico, que en maíz existe principalmente de forma ligada, y se encuentra formando parte de la estructura de la pared celular del pericarpio y brinda una barrera física y química de protección contra la oxidación, patógenos, ataque de insectos y animales (Wang *et al.*, 2014; Boz, 2015). Además del ácido ferúlico del pericarpio, existen algunas variedades de maíz que poseen pigmentación en el grano, la cual, también puede estar presente en el pericarpio y/o en la capa de aleurona, con variación en las tonalidades rojas, azules, moradas y ne-

gras. La pigmentación del grano se atribuye a la presencia de compuestos antioxidantes como antocianinas, flavonoides y taninos condensados, todos ellos con potencial para producir alimentos o bebidas nutraceuticas (Akonor *et al.*, 2014; Chaves-López *et al.*, 2014; Urias-Lugo *et al.*, 2015).

Los productos elaborados a partir del grano pigmentado de maíz son considerados como antioxidantes (Urias-Lugo *et al.*, 2015) y en algunos países son preparadas bebidas a partir de granos de maíz pigmentados (Akonor *et al.*, 2014; Chaves-López *et al.*, 2014). Estas bebidas gracias a su aporte nutrimental son aceptadas, sin embargo, sólo se elaboran de una forma artesanal, tradicional o regional utilizando el tipo de maíz disponible en el lugar en donde se elabore, debido a esto, existe poca información respecto formulaciones, o el efecto en la calidad de estas frente a procesos de conservación (Wang *et al.*, 2014; Carrera *et al.*, 2015; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

En la conservación de alimentos, los tratamientos térmicos son los más utilizados debido a que brinda un producto seguro para el consumo humano y una mayor efectividad en la destrucción de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos (Wang *et al.*, 2014). Estos tratamientos térmicos además de ser una alternativa económica para generar la inocuidad de los alimentos pueden provocar cambios indeseables, como fisicoquímicos, pérdida de nutrientes, formación de componentes por reacción térmica y pérdida de apariencia (Rico *et al.*, 2007; Suarez-Jacobo *et al.*, 2010), así como pérdida de compuestos con capacidad antioxidante (Abdullah y Chin, 2014). En alimentos líquidos el tratamiento térmico más utilizado para la conservación es la pasteurización (Suarez-Jacobo *et al.*, 2011). El efecto de la pasteurización sobre la destrucción de microorganismos e inactivación de enzimas que pueden afectar la apariencia del producto depende en gran medida de la temperatura (Abdullah y Chin, 2014), por otro lado, los cambios generados durante el tiempo de procesamiento, por lo que muchos estudios se han enfocado en el estudio de altas temperaturas con cortos tiempos, utilizando equipos industriales de pasteurización (Rico *et al.*, 2007; Estrada *et al.*, 2010). Sin embargo, es reportado que algunos procesos de pasteurización eficientes utilizan temperaturas de van de los 80, 90 a 95 °C por 10 min aproximadamente (Rawson *et al.*, 2011), pero según Estrada *et al.* (2010) 85 °C por 5 min puede considerarse como una pasteurización artesanal.

Por otro lado, y debido a los inconvenientes causados por el uso de temperaturas superiores a los 80 °C que puede provocar cambios físicos, químicos y biológicos indeseables en los alimentos líquidos el uso la tecnologías emergentes como la termosonicación, la cual combina calentamiento moderado con temperaturas que van de los 37 a 75 °C con el uso del ultrasonido con frecuencias de los 20 kHz a 10 MHz, representa una técnica alternativa para evitar cambios indeseables y favorecer la inactivación de enzimas y microorganismos causales del deterioro de este tipo de alimentos. La acción de la termosonicación provoca el proceso de cavitación, el cual genera burbujas de vapor por los cambios

de presión que después explotan generando calor y presión, dando como resultado una esterilización localizada y disrupción celular (Abdullah y Chin, 2014; Anaya-Esparza *et al.* 2016; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017).

Debido a lo anterior, los cambios generados en los alimentos por los tratamientos térmicos y que hoy en día los consumidores demandan productos con las cualidades de un alimento fresco (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017), el objetivo de este trabajo fue evaluar dos bebidas de maíz, una de maíz blanco y una de maíz morado, así como el efecto de un tratamiento de conservación de tecnología emergente como la termosonicación y un tratamiento térmico tradicional como la pasteurización a 85 °C por 5 min, sobre color contenido de microorganismos, parámetros fisicoquímicos y propiedades nutraceuticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación y obtención de harina

La bebida de maíz se formuló y preparó con el grano de maíz blanco y morado obtenido de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La harina de maíz se obtuvo tostado 500 g de grano en un comal de acero a 145 ± 5 °C por 30 min, la temperatura se monitoreo cada 5 min con un termómetro de infrarrojo; después el grano tostado se molió y tamizó hasta obtener un tamaño de partícula de 0.59 mm (malla 30).

Formulación de bebida de maíz

Los ingredientes de las bebidas de maíz en base al porcentaje consistieron en agua purificada 94.83 %, harina de maíz (*Zea mays* L.), blanco o morado, según el caso 2.37 %, azúcar 1.90 %, extracto natural de Vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks). 0.47 % de canela (*Cinnamomun verum* J. Presl) 0.14 %, de Stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) 0.14 %, goma xantana 0.09 %, carboximetilcelulosa (CMC) 0.05 %.

Tratamientos

Las bebidas de maíz blanco y morado recién preparadas fueron separadas por lotes de 500 mL y refrigeradas toda la noche a 4 °C. Después se llevaron a cabo dos tratamientos de conservación; el tratamiento de termosonicación se realizó en un procesador ultrasónico UIP500hdt (Hielscher USA, Inc., Ringwood, USA) (20 kHz y 500 W) a 80 % de amplitud, con un senotrodo de 18 mm con control de temperatura a 45 °C por 20 min, y el tratamiento térmico de pasteurización a 85 °C por 5 min. La bebida sin proceso de conservación fue utilizada como control.

Parámetros cromáticos

El color de la bebida se determinó llenando una cubeta espectrofotométrica de 3 mL y las mediciones del color se realizaron con un colorímetro (CR-20, Konica Minolta, Japan) con iluminante D65 y un ángulo de 10°. Los parámetros cromáticos se basaron en escala CIELAB ($L^* a^* b^*$) y CIELCH ($L^* C^* h$).

Calidad microbiológica

La calidad microbiológica se determinó en base a lo reportado por Rodríguez-Salinas *et al.* (2019) con diluciones en agua peptonada, para conteos decimales. Los mesófilos aerobios, lactobacilos, enterobacterias, hongos y levaduras, y esporulación fueron enumerados en agar PCA (Plate Count Agar, 37 °C x 48 h), MRS (Man-Rogosa-Sharpe, 37 °C x 48 h con 5 % de CO₂), VRBG (Violet Red Bile Glucose, 37 °C x 24 h), PDA (Potato Dextrose Agar, 25 °C x 5 días) acidificado y PCA (Plate Count Agar 37 °C x 48 h), respectivamente. Los resultados se expresaron en logaritmo de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra (log ufc/mL).

Parámetros fisicoquímicos

El pH se registró con un potenciómetro (Corning, 440), los sólidos totales, en un refractómetro de mano (Master-M 2313, ATAGO, Japan), y acidez titulable en base a lo descrito por Akonor *et al.* (2014).

Compuestos fenólicos

Los fenoles totales, flavonoides totales y taninos condensados se realizaron con base a lo reportado por López-Contreras *et al.* (2015). Los fenoles totales se cuantificaron usando una curva de calibración con ácido gálico (0-200 mg/L) y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro (mg EAG/L). Los flavonoides totales y taninos condensados se cuantificaron usando curvas de calibración con catequina (0-200 mg/L) y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de catequina por litro (mg EC/L). Las antocianinas totales se extrajeron y cuantificaron en base a lo descrito por Rodríguez-Salinas *et al.* (2019). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de cianidina-3-glucósido por litro muestra (mg ECG/L).

Extracción de compuestos fenólicos y análisis cromatográfico (HPLC)

Debido a la viscosidad de la muestra se realizó una extracción siguiendo la metodología descrita por Niño-Medina *et al.* (2017), después, los extractos se filtraron con un acrodisco de 0.25 mm con un tamaño de poro de 45 µm y se almacenaron protegidos de la luz hasta su posterior análisis.

Análisis cromatográfico (HPLC)

Los análisis se realizaron en un equipo HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent, Santa Clara, CA, USA), bomba cuaternaria Agilent 1260 (G1311B) con auto-muestreador, un detector con arreglo de diodos (DAD) Agilent 1260 (G4212B) y una columna analítica ZORBAX Eclipse Plus C-18 (100 mm x 3 mm de i.d., 5 µm). Las fases móviles fueron agua (0.1 % de CH₃COOH, A) y MeOH (0.1 % de CH₃COOH, B), con flujo de 0.6 mL/min a 25 °C, con un tiempo de corrida de 60 min e inyección de muestra de 10 µL. El gradiente utilizado fue el reportado por Santos *et al.* (2014), y se obtuvo el espectro de los compuestos en la región UV (200-400 nm). Los compuestos fenólicos individuales se cuantificaron usando

una curva de calibración con ácido gálico, catequina, ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sinápico y quercetina (0-200 mg/L) y los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de cada compuesto identificado por litro de muestra (mg/L).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante DPPH, ABTS y FRAP se realizó mediante la metodología de López-Contreras *et al.* (2015), los niveles fueron calculados con una curva de calibración con Trolox (0-500 µmol/L) y los resultados se expresaron en micromoles equivalentes de Trolox por litro (µmol ET/L).

Viscosidad

Las curvas de flujo y viscosidad se obtuvieron mediante una prueba rotacional con un reómetro Anton Paar (Rheolab QC, Austria) en función de la tasa de corte de 1 a 500 s⁻¹, utilizando una geometría CC27 a una temperatura de 25 °C.

Análisis estadístico

Los resultados de las muestras se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y las medias se sometieron a la prueba de Tukey (P≤0.05) analizadas mediante el paquete estadístico Minitab (Versión 14). De todas las determinaciones se realizaron cinco repeticiones y los datos se expresan como media ± desviación estándar.







RESULTADOS Y DISCUSIÓN**Parámetros cromáticos**

Los valores de luminosidad (*L*^{*}) entre las bebidas de maíz blanco y morado mostraron diferencias significativas con valores de 35.20 a 37.54 y 31.20 a 36.46, respectivamente, con los valores más altos en la bebida de maíz blanco (Tabla 1). También se encontraron diferencias entre los tratamientos de cada tipo de bebida, obteniendo los menores valores de *L*^{*} en el tratamiento de pasteurización y los mayores en termosonicación.

Estos resultados en las bebidas de maíz blanco y morado indican que el tratamiento de termosonicación no afectó la *L*^{*} de las bebidas (Abdullah y Chin, 2014). Sin embargo, el tratamiento de pasteurización ocasionó oscurecimiento de la bebida, lo que se puede atribuir a la reacción entre azúcares reductores y grupos amino, conocida como reacción de Maillard, reacción frecuente en el procesamiento o cocción de los alimentos (Abdullah y Chin, 2014; Tamanna y Mahmood, 2015; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Los valores de *a*^{*} (Tabla 1) entre las bebidas de maíz blanco y morado variaron de 1.98 a 2.74 y 2.00 a 2.84, respectivamente, sin diferencia entre el tipo de bebida. Con respecto a los tratamientos de cada tipo de bebida, en termosonicación se observaron los valores más bajos en *a*^{*} en ambas bebidas, mientras que en la pasteurización, sólo en la bebida de maíz blanco se observó el incremento de los valores de *a*^{*}, con diferencias estadísticas entre tratamientos de cada tipo de bebida. El valor *b*^{*} de las bebidas de maíz blanco y morado mostraron diferencia estadística entre tipo bebida con

Tabla 1. Parámetros cromáticos de bebidas de maíz blanco y maíz morado.
Table 1. Chromatic parameter of white and purple maize beverages.

Parámetro	Bebida de Maíz Blanco			Bebida de maíz Morado		
	Control	Termosonicación	Pasteurización	Control	Termosonicación	Pasteurización
L^*	36.26±0.47 ^{ab}	37.54±0.86 ^a	35.2±1.32 ^b	33.92±0.13 ^b	36.46±0.17 ^a	31.2±0.19 ^c
a^*	2.5±0.12 ^b	1.98±0.15 ^c	2.74±0.05 ^a	2.84±0.05 ^a	2.00±0.07 ^c	2.66±0.09 ^b
b^*	11.04±0.52 ^b	13.34±0.80 ^a	10.80±0.45 ^b	9.00±0.07 ^b	11.18±0.37 ^a	7.32±0.08 ^c
C^*	11.32±0.56 ^b	13.48±0.83 ^a	11.04±0.54 ^b	9.42±0.04 ^b	11.36±0.33 ^a	7.80±0.10 ^c
h	77.2±0.12 ^b	81.5±0.19 ^a	75.62±0.46 ^c	72.44±0.21 ^b	79.76±0.34 ^a	70.10±0.41 ^c
Color visual						

Diferente letra en la misma línea dentro de cada tipo de bebida de maíz indica diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$). Media \pm Desviación estándar ($n=5$).
Different letter in same line of each kind of maize beverages indicate significant statistical differences ($P \leq 0.05$). Means \pm Standard deviation ($n=5$).

valores de 10.80 a 13.34 y 7.32 a 11.18, respectivamente, con los mayores valores en la bebida de maíz blanco (Tabla 1). Los tratamientos de cada tipo de bebida mostraron diferencias estadísticas, en b^* los menores valores se encontraron en la pasteurización y los mayores en termosonicación.

Los resultados en los valores de a^* y b^* en las bebidas mostraron que el tratamiento de termosonicación incrementó el color verde y amarillo, respectivamente. Esto se debe a que la termosonicación promovió la homogenización de los ingredientes de la bebida y mejoró el color con la distribución de pigmentos naturales (Abdullah y Chin, 2014; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017). Con respecto a la pasteurización los valores de a^* y b^* incrementaron el color rojo y azul, respectivamente. Estos cambios demuestran el efecto de los tratamientos térmicos sobre el color, probablemente debido a la aceleración de productos de la reacción de Maillard (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017; Mondaca-Navarro *et al.*, 2017; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Los valores de Cromaticidad (C^*) y ángulo Hue (h) (Tabla 1), en las bebidas de maíz blanco y morado mostraron diferencias estadísticas en el tipo de bebida con valores de C^* de 11.04 a 13.48 y 7.80 a 11.36, respectivamente, mientras que en h de 75.62 a 81.5 y 70.10 a 76.76, respectivamente, con los mayores valores en la bebida de maíz blanco. Los tratamientos aplicados a cada tipo de bebida mostraron diferencias estadísticas. En ambas bebidas se observó que los

valores más bajos correspondieron a la pasteurización y los mayores a la termosonicación.

Los valores de C^* y h en las bebidas disminuyeron con el tratamiento de pasteurización, a diferencia del tratamiento con termosonicación, el cual incrementó los valores de estos parámetros. Los parámetros de C^* y h son más apropiados para la interpretación del color, ya que C^* indica la saturación del color, el cual en las muestras de este estudio se encontraron en la zona del color gris. En cuanto al valor h , este expresa el color percibido por el ojo humano, para este estudio los valores h de las muestras se expresaron en color amarillo (López-Contreras *et al.*, 2015).

Calidad microbiológica

El contenido de microorganismos (Tabla 2) en los tratamientos control de las bebidas de maíz blanco y morado mostraron valores para mesófilos aerobios de 6.96 y 7.31 log ufc/mL, en coliformes de 5.45 y 7.06 log ufc/mL, con mayores valores en la bebida de maíz morado, y lactobacilos 1.61 y 1.58 log ufc/mL, respectivamente. En los tratamientos de las bebidas de maíz blanco y morado, en termosonicación se observó disminución de mesófilos aerobios con valores de 4.37 y 4.64 log ufc/mL, coliformes 3.06 y 3.88 y lactobacilos de 1.76 y 1.58, respectivamente, mientras que en el tratamiento de pasteurización de ambas bebidas, los microorganismos no fueron detectados.

Tabla 2. Calidad microbiológica de bebidas de maíz blanco y maíz morado.
Table 2. Microbiological quality of white and purple maize beverages.

Análisis	Bebida de Maíz Blanco			Bebida de Maíz Morado		
	Control	Termosonicación	Pasteurización	Control	Termosonicación	Pasteurización
Mesófilos aerobios	6.96±0.05 ^c	4.37±0.03 ^b	ND ^a	7.31±0.04 ^c	4.64±0.02 ^b	ND ^a
Enterobacterias	5.45±0.03 ^c	3.06±0.02 ^b	ND ^a	7.06±0.04 ^c	3.88±0.01 ^b	ND ^a
Lactobacilos	1.61±0.02 ^b	1.76±0.02 ^c	ND ^a	1.58±0.02 ^b	1.58±0.02 ^b	ND ^a
Hongos y levadura	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a
Esporas	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a	ND ^a

Diferente letra en la misma línea dentro de cada tipo bebida de maíz indica diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$). Media \pm Desviación estándar ($n=5$). ND = No detectado.
Different letters in same line of each kind of maize beverages indicate significant statistical differences ($P \leq 0.05$). Means \pm Standard deviation. ($n=5$). ND = Not detected.

La carga microbiana de las bebidas control de maíz blanco y morado después del tratamiento de termosonicación mostraron disminución en mesófilos aerobios de 2.59 y 2.67, en coliformes de 2.39 y 3.18, sin embargo, a pesar de la reducción de microorganismos, estos resultados son menores a 5 log ufc/mL requeridas por la FDA en el uso de tratamientos con tecnologías emergentes para asegurar la inocuidad de los alimentos (Roig-Sagués *et al.*, 2015). Cabe mencionar que, el efecto de termosonicación está influenciada por la especie del microorganismo y componentes del alimento, ya que cada uno de estos elementos posee resistencia a la fuerza o tensión de rotura, lo que ofrece un efecto en la distribución de la onda generada por el ultrasonido (Abdullah y Chin, 2014; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017), por lo que deben realizarse pruebas para obtener las condiciones óptimas en esta bebida. Por otro lado, la pasteurización provocó la inactivación total de los microorganismos. Estos resultados demuestran que los tratamientos térmicos tradicionales utilizados para la conservación de bebidas como es la pasteurización, resulta ser un proceso eficiente, accesible, seguro y económico para la eliminación de microorganismos causantes del deterioro (Abdullah y Chin, 2014; Amir *et al.*, 2014).

Parámetros fisicoquímicos

El pH en la bebida de maíz blanco mostró diferencia con valores de 6.21 a 6.35 con menor valor en el tratamiento control y el mayor en pasteurización (Tabla 3). En la bebida de maíz morado los valores variaron entre 6.23 a 6.29, sin diferencia entre tratamientos, con el menor valor en la pasteurización y el mayor valor en el control. La acidez titulable no mostró diferencia, debido a que todos los tratamientos mostraron valores de 0.03 % de equivalentes de ácido málico. Los valores en el contenido de sólidos totales de las bebidas de maíz blanco fueron 2.32, 2.35 y 2.41, para el control, termosonicación y pasteurización, respectivamente, con el mayor valor en pasteurización. En cuanto a la bebida de maíz morado los valores fluctuaron de 2.31 a 2.37 con el menor valor para termosonicación y el mayor e igual valor se mostró en el control y pasteurización.

El valor de pH y contenido de sólidos totales sólo en la bebida de maíz blanco mostró un incremento después del tratamiento de pasteurización, a diferencia de la bebida de maíz morado que obtuvo el comportamiento contrario, sin diferencia estadística entre las muestras. El efecto de la bebida de maíz blanco pudiera ser atribuido a evaporación de agua (Kathiravan *et al.*, 2014), así como la homogenización

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos, compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes en bebidas de maíz blanco y maíz morado.
Table 3. Physicochemical parameter, phenolic compounds and antioxidant capacity in white and purple maize beverages.

Parámetros	Bebida de Maíz Blanco			Bebida de maíz Morado		
	Control	Termosonicación	Pasteurización	Control	Termosonicación	Pasteurización
pH	6.21±0.01 ^b	6.29±0.10 ^{ab}	6.35±0.01 ^a	6.29±0.08 ^a	6.25±0.06 ^a	6.23±0.01 ^a
Acidez titulable (%)	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a	0.03±0.01 ^a
Sólidos totales (%)	2.32±0.02 ^b	2.35±0.01 ^b	2.41±0.01 ^a	2.37±0.02 ^a	2.31±0.02 ^b	2.37±0.02 ^a
Fenoles totales (mg EAG/L)	101.49±0.3 ^b	95.23±1.63 ^c	116.05±0.31 ^a	101.36±1.75 ^b	99.25±1.38 ^b	128.29±4.12 ^a
Flavonoides totales (mg EC/L)	43.41±4.33 ^c	61.75±2.20 ^b	72.30±5.35 ^a	53.13±4.11 ^b	64.80±1.73 ^a	70.36±3.36 ^a
Taninos condensados (mg EC/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Antocianinas totales (mg EC3G/L)	1.03±0.07 ^a	0.97±0.07 ^a	0.89±0.14 ^a	1.09±0.09 ^a	1.11±0.10 ^a	1.20±0.14 ^a
Ácido clorogénico (mg/L)	13.51±0.64 ^b	20.29±1.25 ^a	ND ^c	37.14±3.77 ^a	39.58±0.99 ^a	ND ^b
Ácido cafeico (mg/L)	ND ^b	ND ^b	16.46±0.96 ^a	ND ^b	ND ^b	33.26±0.44 ^a
Ácido ferúlico (mg/L)	45.77±1.07 ^b	48.18±0.99 ^{ab}	48.90±0.41 ^a	36.46±0.55 ^b	41.72±1.01 ^a	40.57±0.68 ^a
DPPH (µmol ET/L)	163.67±6.01 ^b	176.44±6.31 ^b	267.56±5.09 ^a	312.00±11.67 ^b	311.44±5.09 ^b	384.78±6.31 ^a
ABTS (µmol ET/L)	473.84±26.68 ^a	461.24±36.43 ^{ab}	389.90±28.26 ^b	519.30±5.84 ^a	527.90±38.21 ^a	449.30±12.34 ^b
FRAP (µmol ET/L)	815.00±25.00 ^c	921.67±7.64 ^b	1283.33±55.75 ^a	1093.33±85.20 ^b	1168.33±12.58 ^b	1566.67±80.36 ^a

Diferente letra en la misma línea dentro de cada tipo de bebida de maíz indica diferencia estadística ($P \leq 0.05$). Media \pm Desviación estándar ($n=5$). ND = no detectado

Different letters in same line of each kind of maize beverages indicate statistical differences ($P \leq 0.05$). Means \pm Standard deviation ($n=5$). ND = not detected.

de los sólidos al realizar la toma de muestra. Por otro lado, en la bebida de maíz morado los valores de pH, sólidos totales y acidez titulable, aunque mostraron diferentes valores, estos no mostraron diferencia estadística en sus valores, por lo que podemos mencionar que los tratamientos de termosonicación y pasteurización no ocasionaron alteraciones considerables en los parámetros fisicoquímicos en las bebidas (Rabie *et al.*, 2015; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Compuestos fenólicos

El contenido de fenoles totales de las bebidas mostró valores de 95.23 a 116.05 y 99.25 a 128.29 mg EAG/L en maíz blanco y morado, respectivamente (Tabla 3). En ambas bebidas el efecto de los tratamientos fue similar, se encontraron diferencias entre los tratamientos de cada tipo de bebida, los menores valores se encontraron en los tratamientos de termosonicación y los mayores en la pasteurización. Estos resultados se atribuyen a que la alta temperatura generada por el tratamiento de pasteurización puede provocar la hidrólisis del enlace O-glucosídico de los azúcares presentes, como en este la sacarosa añadida en la formulación, la cual después de un proceso de hidrólisis por tratamiento térmico del azúcar puede dejar disponible el grupo reductor de la glucosa y fructosa para reaccionar con un grupo amino y generar la llamada reacción de Maillard, generando compuestos como las melanoidinas, moléculas con capacidad antioxidante (Tamanna y Mahmood, 2015; Mondaca-Navarro *et al.*, 2017). Además, el calentamiento también puede favorecer la hidrólisis de compuestos fenólicos presentes de forma ligada, debido a que en ambas bebidas se observó el mismo efecto en la pasteurización (Wang *et al.*, 2014).

El contenido de flavonoides de las bebidas de maíz blanco y morado no mostraron diferencia, los valores encontrados fueron de 43.41 a 72.30 y 53.13 a 70.36 mg EC/L, respectivamente (Tabla 3). Los tratamientos de las bebidas mostraron diferencia, con los menores valores en el control y los mayores en pasteurización. Principalmente, el incremento en la identificación de flavonoides en las bebidas se puede atribuir a que en el maíz existen una amplia diversidad de grupos flavonoides como flavonoles (quercetina, rutina y ramnetina) y flavonas (luteolina) (Biesaga, 2011). Los flavonoides tienen una estructura básica conformada por dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un puente de tres carbonos, donde se forma un anillo pirano (C) (De Souza y De Giovanni, 2005) y la hidroxilación y/o metilación del anillo C origina los diferentes grupos flavonoides (Martínez-Flórez *et al.*, 2002). Asimismo, los flavonoides son muy efectivos para formar complejos con iones metálicos, los cuales proporcionan diferentes colores a las flores (Santos *et al.*, 2002; Amat *et al.*, 2010). Por tanto, los flavonoides totales de una muestra se cuantifican con la adición de iones metálicos, como un por ejemplo de esto es el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) que se utiliza para formar complejos de flavonoides con aluminio (Denni y Mammen, 2012). Sin embargo, una de las deficiencias del ensayo con $AlCl_3$, es que interfiere de los alguno de los

grupos hidroxilo por la formación de enlaces con azúcares (glicosídicos) en cualquiera de los carbonos de las posiciones 3, 5, 3' o 4' de los anillos B o C, respectivamente, evita la formación de complejos (flavonoide-metal) con el Aluminio (Al) (Denni y Mammen, 2012; Pękal y Pyszynska, 2014).

Los flavonoles y flavonas, poseen la característica de generar enlaces glicosídicos en la posición 3 del anillo B del flavonoide (Martínez-Flórez *et al.*, 2002), característica utilizada para mejorar su estabilidad frente a la radiación UV y proteger de la oxidación a los tejidos vegetales (Smith *et al.*, 2000). Por tanto, en el presente experimento, el análisis de la bebida de maíz sin pasteurizar pudo provocar una subestimación de los flavonoides totales, debido al bloqueo existente en el enlace glicosídico característico de los flavonoles y flavonas del maíz, los cuales pueden evitar la formación del complejo metálico con el Al. Sin embargo, los flavonoides totales de la bebida fueron mayormente detectados después del proceso de pasteurización. Esta detección se puede atribuir a que el calentamiento extremo generado por la pasteurización puede generar hidrólisis en los enlaces glicosídicos, lo que permite a los flavonoides desbloquear sus grupos hidroxilo para formar complejos metálicos e incrementar su detección por métodos espectrofotométricos (Pękal y Pyszynska, 2014; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019). Lo anteriormente mencionado, sugiere que el incremento en la detección de flavonoides de las bebidas de maíz blanco y morado se debió principalmente al efecto del proceso de pasteurización, lo que podría eliminar la posibilidad de que el incremento en la detección de flavonoides totales sea atribuido al ligero aumento de sólidos totales, observado sólo en la bebida de maíz blanco, después de la pasteurización.

Los taninos condensados no fueron detectados en ninguna de las bebidas de maíz, lo que se atribuye principalmente a la poca cantidad de la harina de maíz presente en la formulación. Con respecto al contenido de antocianinas en las bebidas de maíz blanco y morado (Tabla 3), los resultados de este experimento mostraron diferencia significativa en el tipo bebida, obteniendo valores de 0.89 a 1.03 y 1.09 a 1.20 mg EC3G/L respectivamente, con los mayores valores en la bebida de maíz morado. En cuanto a los tratamientos de termosonicación y pasteurización aplicados a cada tipo de bebida no se observaron diferencias estadísticas en el contenido de antocianinas. Las bajas concentraciones de antocianinas se atribuyeron a la dilución de la harina de maíz en la bebida, además a que este tipo de compuestos son solubles en agua (Lao y Giusti, 2016), por lo que se requiere de un método eficiente para eliminar agua y concentrar las antocianinas.

El contenido de ácido clorogénico en las bebidas de maíz blanco y morado mostraron diferencia significativa, los valores encontrados fueron de 13.51 a 20.29 y 37.14 y 39.58 mg/L, respectivamente (Tabla 3), siendo la bebida de maíz morado la que mostró el mayor contenido de este ácido. En los tratamientos de la bebida de maíz blanco se encontró diferencia con el mayor contenido en el tratamiento de termosonicación (Figura 1, a y b). En la bebida de maíz morado

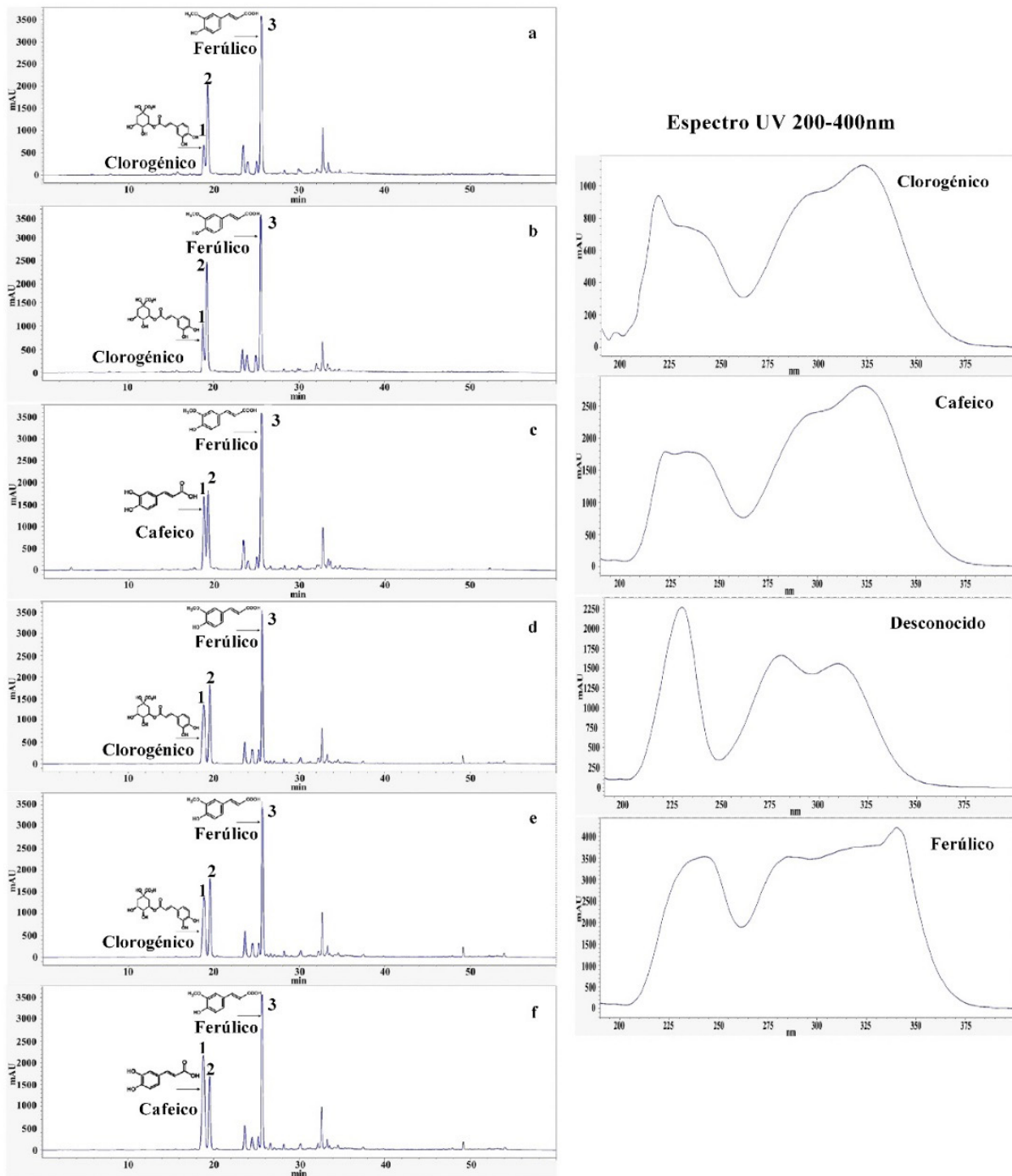


Figura 1. Cromatogramas de bebidas de maíz y espectro de UV-200-400 nm de los picos detectados. Bebida maíz blanco control, 1. Ácido clorogénico, 2. Desconocido, 3. Ácido ferúlico. Bebida maíz blanco con termosonicación, 1. Ácido clorogénico, 2. Desconocido, 3. Ácido ferúlico.

Bebida maíz blanco con pasteurización, 1. Ácido cafeico, 2. Desconocido, 3. Ácido ferúlico.

Bebida maíz morado control, 1. Ácido clorogénico, 2. Desconocido, 3. Ácido ferúlico.

Bebida maíz morado con termosonicación, 1. Ácido clorogénico, 2. Desconocido, 3. Ácido ferúlico.

Bebida maíz morado con pasteurización, 1. Ácido cafeico, 2. Desconocido, 3. Ácido ferúlico.

Figure 1. Chromatograms of maize beverages and UV spectrum 200-400 nm of peaks detected.

a) White maize beverage control, 1. Chlorogenic acid, 2. Unknown, 3. Ferulic acid. b) White thermosonicated maize beverage, 1. Chlorogenic acid, 2. Unknown, 3. Ferulic acid.

c) White pasteurized maize beverage, 1. Caffeic acid, 2. Unknown, 3. Ferulic acid. d) Purple control maize beverage, 1. Chlorogenic acid, 2. Unknown, 3. Ferulic acid.

e) Purple thermosonicated maize beverage, 1. Chlorogenic acid, 2. Unknown, 3. Ferulic acid. f) Purple pasteurized maize beverage, 1. Caffeic acid, 2.

Unknown, 3. Ferulic acid.

no se observó diferencia entre el control y termosonicación (Figura 1, d y e). En el tratamiento de pasteurización para cada una de las bebidas no se detectó el ácido clorogénico, sin embargo, sólo en estos tratamientos se detectó ácido cafeico (Figura 1, c y f), con valores de 16.46 y 33.26 mg/L en la bebida de maíz blanco y morado, respectivamente, con los valores más altos en la bebida de maíz morado.

Los resultados obtenidos mostraron que la termosonicación incrementó la detección y/o liberación de ácido clorogénico, ya que este puede encontrarse esterificado a los polisacáridos de la pared celular (Parr y Bolwell, 2000). Además, se observó que la termosonicación no mostró efecto de hidrólisis en la molécula del ácido clorogénico a diferencia de la pasteurización. En el tratamiento de pasteurización el ácido clorogénico no se detectó en ninguna de las bebidas, esto se debe a que la molécula de ácido clorogénico está constituida por un ácido quínico esterificado al ácido cafeico (Santos *et al.*, 2014), y este enlace éster puede hidrolizarse por efecto térmico en soluciones acuosas (Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Los valores de ácido ferúlico (Tabla 3), obtenidos de los cromatogramas de las bebidas de maíz blanco y morado (Figura 1, a y f), mostraron diferencias significativas en el tipo de bebida con valores de 45.77 a 48.90 y 36.46 a 41.72 mg/L, respectivamente, siendo la bebida de maíz blanco la que mostró el mayor contenido. En los tratamientos de ambas bebidas se observaron diferencias significativas con los menores valores en el control, mientras que los mayores valores en los tratamientos de termosonicación y pasteurización.

Los resultados en el contenido de ácido ferúlico mostraron un incremento por efecto de los tratamientos de termosonicación y pasteurización, esto se atribuye a que ambos tratamientos tuvieron efecto de liberación de ácido ferúlico, que en los cereales es uno de los principales ácidos fenólicos encontrados de forma ligada a polisacáridos de la pared celular (Boz, 2015; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante en las bebidas de maíz blanco y morado mostraron diferencia significativa independientemente del método utilizado. Para DPPH se observaron valores de 163.67 a 267.56 y 311.48 a 384.78 $\mu\text{mol ET/L}$, mientras que para el método de FRAP la capacidad antioxidante varió de 815.00 a 1283.33 y 1093.33 a 1566.67 $\mu\text{mol ET/L}$, respectivamente, siendo la bebida de maíz morado la que mostró mayor capacidad antioxidante (Tabla 3). En todas las bebidas de maíz en estudio se observó el mismo comportamiento, la diferencia entre sus tratamientos fue del menor valor para el control y termosonicación, y el mayor en la pasteurización.

Además, es importante mencionar que para los métodos de DPPH y FRAP, los valores de capacidad antioxidante mostraron incrementos con la termosonicación y pasteurización. Durante la termosonicación ocurre cavitación, a lo que podría atribuirse el incremento del ácido ferúlico, el cual pudiera haber sido liberado de la pared celular (Abdullah y

Chin, 2014; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017). Asimismo, para el tratamiento de pasteurización, la reacción de Maillard podría causar sinergismo entre los fitoquímicos y las melanoidinas, así como la liberación de ácido ferúlico, considerado como un potente antioxidante (Boz, 2015; Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Para el método de ABTS, la capacidad antioxidante de las bebidas mostró diferencia significativa con valores que oscilaron de 389.90 a 473.84 y 449.30 a 527.90 $\mu\text{mol ET/L}$ en la de maíz blanco y morado, respectivamente, con la mayor capacidad antioxidante en la bebida de maíz morado (Tabla 3). En los tratamientos de las bebidas de maíz blanco y morado se encontró que el menor valor fue para la pasteurización, mientras que los mayores en control y termosonicación.

Asimismo, se pudo observar que la capacidad antioxidante en ABTS para ambas bebidas de maíz no se vieron afectadas por el tratamiento con termosonicación. Este efecto pudiera ser atribuido a que este tratamiento evita la degradación de compuestos sensibles al calor, y por lo tanto mantiene las características antioxidantes. Además, existe evidencia que el uso de la termosonicación inactiva enzimas causantes de la disminución de compuestos fenólicos, como es la polifenol oxidasa (Abdullah y Chin, 2014; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2017). Sin embargo, la capacidad antioxidante en ABTS mostró disminución por efecto de la pasteurización, esto debido a que los procesos térmicos con alta temperatura posiblemente pueden provocar transformaciones químicas de compuestos fenólicos o formación de complejos de estos compuestos con otras sustancias (Salas *et al.*, 2018) lo que impide su capacidad de ceder electrones (Rodríguez-Salinas *et al.*, 2019).

Viscosidad

Los valores de viscosidad en las bebidas de maíz blanco y morado mostraron un comportamiento pseudo-plástico, de acuerdo con la ley de potencia. No se observaron diferencias significativas entre las diferentes bebidas para el coeficiente de consistencia (K), y para el índice de flujo (n) (Tabla 4), tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados a cada tipo de bebida.

Los resultados en este trabajo mostraron que la viscosidad de las bebidas no mostró un efecto por el tratamiento de termosonicación. Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado por Anaya-Esparza *et al.* (2017), quienes mencionaron que el tratamiento con termosonicación no afecta la viscosidad, y además, podría mejorar la viscosidad, ya que favorece la distribución y disminuye el tamaño de los hidrocoloides.

Por otro lado, algunos estudios realizados con termosonicación han reportado pérdida de viscosidad, esto ocasionado por el daño permanente a los hidrocoloides, sin embargo, estos resultados dependen en gran medida a la energía y tiempo de aplicación del ultrasonido (Rojas y Augusto, 2018). En cuanto al tratamiento de pasteurización, este tampoco disminuyó la viscosidad, estos resultados corroboran las propiedades de las gomas como estabilizantes

Tabla 4. Parámetros de viscosidad en bebidas de maíz blanco y maíz morado.
Table 4. Viscosity parameters in white and purple maize beverages.

Parámetros de viscosidad	Bebida de Maíz Blanco			Bebida de maíz Morado		
	Control	Termosonicación	Pasteurización	Control	Termosonicación	Pasteurización
K (Pas)	-2.35±0.47 ^a	-3.24±0.76 ^a	-1.99±0.25 ^a	-2.52±0.44 ^a	-3.84±1.82 ^a	-2.29±0.18 ^a
N	0.63±0.09 ^a	0.76±0.14 ^a	0.58±0.04 ^a	0.65±0.08 ^a	0.83±0.33 ^a	0.64±0.03 ^a

Diferente letra en la misma línea dentro de cada tipo de bebida de maíz indica diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$). Media \pm Desviación estándar ($n=5$).

Different letters in same line of each kind of maize beverages indicate significant statistical differences ($P \leq 0.05$). Means \pm standard deviation ($n=5$).

de bebidas y su uso efectivo frente a tratamientos térmicos (Paquet *et al.*, 2014; Sun-Waterhouse *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

Los tratamientos aplicados a las bebidas en estudio mostraron ligeros cambios en el color. Ambos tratamientos disminuyeron el conteo de microorganismos, sin embargo, a diferencia de la termosonicación, la pasteurización mostró el 100 % de letalidad. Por tanto, es necesario evaluar el efecto del incremento de la fuerza del ultrasonido y/o combinarlo con otros métodos de tecnología emergente, para incrementar su eficiencia. Los dos tratamientos no afectaron la viscosidad, calidad fisicoquímica de las bebidas, y facilitaron la identificación y/o liberación de compuestos fenólicos.

Por otro lado, la pasteurización, provocó la hidrólisis de ácido clorogénico lo que incrementó la identificación del ácido cafeico, así como liberación del ácido ferúlico, lo que ocasionó un incremento de la capacidad antioxidante por los métodos de DPPH y FRAP en ambas bebidas. En ambas bebidas el contenido de compuestos fenólicos totales fue similar. En la bebida de maíz blanco se observó el mayor contenido de ácido ferúlico, mientras que en la de maíz morado destacaron el ácido clorogénico, cafeico y capacidad antioxidante. Por lo que se puede mencionar que la bebida de maíz morado mostró mayor capacidad antioxidante en comparación con la bebida de maíz blanco.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo al programa del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a la Facultad de Agronomía, a la Facultad de Ciencias Biológicas de Universidad Autónoma de Nuevo León, al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., Sede Noreste, al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán.

REFERENCIAS

- Aamir, M., Ovissipour, M., Rasco, B., Tang, J., y Sablani, S. (2014). Seasonality of the thermal kinetics of color changes in whole spinach (*Spinacia oleracea*) leaves under pasteurization conditions. *International Journal of Food Properties*, 17(9): 2012-2024.
- Abdullah, N., y Chin, N.L. (2014). Application of thermosonication treatment in processing and production of high quality

and safe-to-drink fruit juices. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2: 320-327.

- Akonor, P.T., Tortoe, C., y Oduro-Yeboah, C. (2014). Physicochemical characterization of non-alcoholic beverages produced from malted roasted varieties of maize (*Zea mays*). *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 4(1): 20-26.
- Amat, A., Clementi, C., Miliani, C., Romani, A., Sgamellotti, A., y Fantacci, S. (2010). Complexation of apigenin and luteolin in weld lake: a DFT/TDDFT investigation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(25): 6672-6684.
- Anaya-Esparza, L.M., Velázquez-Estrada, R.M., Roig, A.X., García-Galindo, H.S., Sayago-Ayerdi, S.G., y Montalvo-González, E. (2017). Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in Food Science & Technology*, 61: 26-37.
- Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of chromatography A*, 1218(18): 2505-2512.
- Boz, H. (2015). *p*-Coumaric acid in cereals: presence, antioxidant and antimicrobial effects. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(11): 2323-2328.
- Carrera, Y., Utrilla-Coello, R., Bello-Pérez, A., Alvarez-Ramirez, J., y Vernon-Carter, E.J. (2015). In vitro digestibility, crystallinity, rheological, thermal, particle size and morphological characteristics of pinole, a traditional energy food obtained from toasted ground maize. *Carbohydrate Polymers*, 123: 246-255.
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C.D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., y Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: the Colombian heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5): 1031-1048.
- De Souza, R.F., y De Giovani, W.F. (2005). Synthesis, spectral and electrochemical properties of Al (III) and Zn (II) complexes with flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 61(9): 1985-1990.
- Denni, M., y Mammen, D. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food chemistry*, 135(3): 1365-1368.
- Estrada, E., Lengua, R., Pino, J., Alvis, R., Bazán, D., Becerra, E., Sandívar, J., Carhuacho, M., Osorio, A., y Caja, V.R. (2010). Proceso para obtener bebida nutracéutica a partir de *Myrciaria Dubia* (Camu Camu), orientado a reducir efecto genotóxico en niños de edad escolar. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 12(2): 34-41.
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., y Fernández-Gutiérrez, A. (2017). Alternatives to conventional

- thermal treatments in fruit-juice processing. Part 2: Effect on composition, phytochemical content, and physicochemical, rheological, and organoleptic properties of fruit juices. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(3): 637-652.
- Kathiravan, T., Nadanasabapathi, S., y Kumar, R. (2014). Standardization of process condition in batch thermal pasteurization and its effect on antioxidant, pigment and microbial inactivation of Ready to Drink (RTD) beetroot (*Beta vulgaris* L.) juice. *International Food Research Journal*, 21(4): 1305-1312.
- Lao, F., y Giusti, M.M. (2016). Quantification of purple corn (*Zea mays* L.) anthocyanins using spectrophotometric and HPLC approaches: method comparison and correlation. *Food Analytical Methods*, 9(5): 1367-1380.
- López-Contreras, J.J., Zavala-García, F., Urias-Orona, V., Martínez-Avila, G.C.G., Rojas, R., y Guillermo, N.M. (2015). Chromatic, phenolic and antioxidant properties of Sorghum bicolor genotypes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(2): 366-370.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J.M., y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición hospitalaria*, 17(6): 271-278.
- Mondaca-Navarro, B.A., Ávila-Villa, L.A., González-Córdova, A.F., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Campas-Baypoli, O.N., y Rodríguez-Ramírez, R. (2017). Antioxidant and chelating capacity of Maillard reaction products in amino acid-sugar model systems: applications for food processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(11): 3522-3529.
- Niño-Medina, G., Muy-Rangel, D., y Urias-Orona, V. (2017). Chickpea (*Cicer arietinum*) and soybean (*Glycine max*) hulls: byproducts with potential use as a source of high value-added food products. *Waste and Biomass Valorization*, 8(4): 1199-1203.
- Paquet, É., Hussain, R., Bazinet, L., Makhoul, J., Lemieux, S., y Turgeon, S.L. (2014). Effect of processing treatments and storage conditions on stability of fruit juice based beverages enriched with dietary fibers alone and in mixture with xanthan gum. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1): 131-138.
- Parr, A.J., y Bolwell, G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7): 985-1012.
- Pełka, A., y Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Analytical Methods*, 7(9): 1776-1782.
- Rabie, M.A., Soliman, A.Z., Diaconeasa, Z.S., y Constantin, B. (2015). Effect of Pasteurization and Shelf Life on the Physicochemical Properties of Physalis (*Physalis peruviana* L.) Juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6): 1051-1060.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P., Garcia-Casal, y M.N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1): 105-112.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B.K., Noci, F., Koutchma, T., y Brunton, N. (2011). Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, 44(7): 1875-1887.
- Rico, D., Martín-Diana, A.B., Barat, J.M., y Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 18(7): 373-386.
- Rodríguez-Salinas, P.A., Muy-Rangel, D., Urias-Orona, V., Zavala-García, F., Suarez-Jacobo, A., Heredia, J.B., Rubio-Carrasco, W., y Nino-Medina, G. (2019). Thermal processing effects on the microbiological, physicochemical, mineral, and nutraceutical properties of a roasted purple maize beverage. *Farmacia*, 67(4): 587-595.
- Rojas, M.L., y Augusto, P.E. (2018). Ethanol and ultrasound pre-treatments to improve infrared drying of potato slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 49: 65-75.
- Roig-Sagués, A.X., Asto, E., Engers, I., y Hernández-Herrero, M.M. (2015). Improving the efficiency of ultra-high pressure homogenization treatments to inactivate spores of *Alicyclobacillus* spp. in orange juice controlling the inlet temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 63(2): 866-871.
- Salas, R., Ordoñez, E., y Reátegui, D. (2018). Polifenoles totales y capacidad antioxidante (DPPH y ABTS) en cuatro variedades de frejol (*Phaseolus vulgaris* L.) crudo seco, remojado y cocido. *Revista Investigación y Amazonia*, 5 (1 y 2): 55-62.
- Santos, J.P., Zaniquelli, M.E.D., De Giovani, W.F., y Galembeck, S.E. (2002). Aluminum ion complex formation with 3-hydroxyflavone in Langmuir and Langmuir-Blodgett films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 198: 569-576.
- Santos, J., Oliveira, M.B.P.P., Ibáñez, E., y Herrero, M. (2014). Phenolic profile evolution of different ready-to-eat baby-leaf vegetables during storage. *Journal of Chromatography A*, 1327: 118-131.
- Smith, G.J., Thomsen, S.J., Markham, K.R., Andary, C., y Cardon, D. (2000). The photostabilities of naturally occurring 5-hydroxyflavones, flavonols, their glycosides and their aluminium complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 136(1-2): 87-91.
- Suárez-Jacobo, Á., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., y Saldo, J. (2010). Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice: a preliminary study of microbial shelf-life. *International journal of food microbiology*, 136(3): 261-267.
- Suárez-Jacobo, Á., Rüfer, C.E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagués, A.X., y Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food chemistry*, 127(2): 447-454.
- Sun-Waterhouse, D., Bekkour, K., Wadhwa, S.S., y Waterhouse, G.I. (2014). Rheological and chemical characterization of smoothie beverages containing high concentrations of fibre and polyphenols from apple. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2): 409-423.
- Tamanna, N., y Mahmood, N. (2015). Food processing and maillard reaction products: effect on human health and nutrition. *International journal of food science*.
- Urias-Lugo, D.A., Heredia, J.B., Serna-Saldivar, S.O., Muy-Rangel, M.D., y Valdez-Torres, J.B. (2015). Total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity of native and elite blue maize hybrids (*Zea mays* L.). *CyTA-Journal of Food*, 13(3): 336-339.
- Wang, T., He, F., y Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, 7: 101-111.

Soluciones hidratantes en dos cultivares de nardo (*Polianthes tuberosa*): respuestas físicas, fisiológicas y bioquímicas

Hydrating solutions in two tuberose (*Polianthes tuberosa*) cultivars: physical, physiological and biochemical responses

Sandy Lizbeth Fernando-Santos¹, Gloria Alicia Pérez-Arias^{1*}, Iran Alia-Tejagal¹, Clara Pelayo Zaldívar², Víctor López-Martínez², Porfirio Juárez-López², Dagoberto Sánchez-Guillén¹

¹ Facultad de Ciencias Agropecuarias, ³Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad, Núm. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos. C. P. 62209.

² Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, México, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina. 09340. Iztapalapa, Distrito Federal, México.

RESUMEN

Espigas de nardo (*Polianthes tuberosa*) 'Mexicano' y 'Perla' con 5 ó 1 flores basales abiertas, se trataron con soluciones hidratantes (SH) conteniendo ácido gibbélico (AG₃), benciladenina (BA), ácido amino-oxiácético (AOA), ácido cítrico (AC), sacarosa (Sac) o hidroxiquinoleina citrato (HQC) con el objetivo de evaluar los cambios físicos, químicos y fisiológicos durante poscosecha, para posteriormente desarrollar tecnologías que incrementen la vida útil de esta especie ornamental. Se utilizó un experimento completamente al azar, la unidad experimental fue una espiga con seis a ocho repeticiones. Los resultados indican que el peso fresco relativo, consumo de agua y número de flores abiertas se incrementó; la respiración y azúcares totales disminuyeron en ambas variedades, cuando se aplicaron SH con AC o BA. La apariencia fue buena por cinco días en 'Mexicano' en las espigas hidratadas con AC o BA+ Sac y en 'Perla' por siete días en todos los tratamientos donde se aplicó SH. La actividad de peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa fue mayor en las espigas testigo y menor cuando se aplicaron las SH con BA + Sac o AC. En conclusión, la hidratación con AC ó BA mejoran el metabolismo y calidad de las espigas de nardo 'Mexicano' y 'Perla' en poscosecha.

Palabras clave: Nardo; peroxidasa; catalasa; superóxido dismutasa; respiración.

ABSTRACT

Tuberose (*Polianthes tuberosa*) 'Mexicano' and 'Perla' spikes, were harvested with 5 or 1 open basal flowers, and then treated with hydrating solutions containing gibberellic acid, benzyladenine, amino oxyacetic acid, citric acid, sucrose or hydroxyquinoline citrate, to evaluate postharvest physical, chemical and physiological changes, for a later technological development to increase the useful life of this ornamental plant. We used a randomized experimental design, with a spike as the experimental unit and six or eight repetitions. Our results indicate that in both varieties, the relative fresh weight and water consumption and the number of open flowers increased, while respiration and total sugars decreased, when treated with HS containing AC or BA. The appearance

was good for five days in 'Mexicano' spikes hydrated with AC or BA + Sac, while in 'Perla', for seven days in all HS-applied treatments. Peroxidase, catalase and superoxide dismutase enzymatic activities were high in control spikes and low when hydrated with AC or BA. In conclusion, hydration with AC or BA improves the metabolism and quality of 'Mexicano' and 'Perla' spikes.

Key words: Tuberose, peroxidase, catalase, superoxide dismutase, respiration.

INTRODUCCIÓN

El nardo es una planta ornamental originaria de México (Trueblood, 1973), que fue dispersada alrededor del mundo en el siglo XVI (Barba *et al.*, 2012). En México y Cuba, actualmente se utiliza mayoritariamente como flor de corte para adornar diferentes eventos sociales, en arreglos florales y apreciada por su peculiar aroma (González, 2016). En la República Mexicana la mayor parte de la producción se concentra en los estados de Morelos, Oaxaca, Guerrero, Veracruz y Puebla donde se cultivan 306.15 hectáreas de esta especie y que generan 61.9 millones de pesos en ventas anuales, en el estado de Morelos el nardo se ubica entre los principales cultivos de flores de corte (SIAP, 2020). En los sistemas de producción de nardo en Morelos, la variedad con flores sencillas se le llama 'Mexicano' y a las de flores dobles se le conoce como 'Perla' (Vázquez, 2004).

En poscosecha las flores de corte son colocados en agua, soluciones pulso o soluciones hidratantes para mantener por más tiempo su vida en florero. Las soluciones pulso de acondicionamiento se refieren a diferentes tratamientos postcosecha de saturación de los tejidos, en los que se aplican soluciones de azúcar, ácidos orgánicos, inhibidores de la síntesis o acción del etileno y/o bactericidas, inmediatamente después de la cosecha o después del almacenamiento en temperatura baja de flores o follajes de corte; el tratamiento de acondicionamiento es de corta duración alcanzando un máximo de 48 horas (Días *et al.*, 2005). Las soluciones hidratantes, por otra parte, mejoran el consumo de agua al disminuir drásticamente el pH (entre 3 y 3.5) y trabajan mejor sin adicionarle azúcares (Maree y Van-Wyck, 2010).

*Autor para correspondencia: Gloria Alicia Pérez-Arias
Correo electrónico: yoyaly@hotmail.com

Recibido: 14 de junio de 2020
Aceptado: 11 de agosto de 2020

Diversos investigadores indican que la aplicación de soluciones pulso de 10 ó 20 % de sacarosa (Sac) por 6 a 24 h, incrementan la vida poscosecha de las espigas de nardo (Pérez *et al.*, 2019) debido a que la sacarosa ayuda a mantener el balance hídrico y ayuda a mantener la integridad de la membrana plasmática y de la mitocondria (Hutchinson *et al.*, 2003). La aplicación de soluciones hidratantes con ácido gibérelico (AG₃; 40 mg L⁻¹) por 24 h retrasa la senescencia de flores e incrementa la vida poscosecha de nardo (Abbasi y Hassanpour, 2011). La benciladenina (BA; 10-50 mM) combinada con solución pulso de 20 % de sacarosa incrementó la vida útil de flores de nardo (Uthairatanakij *et al.*, 2007). El ácido cítrico (AC), se utiliza ampliamente en soluciones preservadoras, debido a que mejora el balance y reduce la obstrucción del tallo, al disminuir el pH disminuye el crecimiento de bacterias (Arief, 2016). El ácido amino-oxiacético (AOA) se adiciona como un inhibidor de la síntesis de etileno (Arief, 2016).

El objetivo del presente trabajo fue determinar respuestas físicas, químicas y fisiológicas de variedades de nardo nativas mexicanas: 'Mexicano' y 'Perla' en poscosecha, previa aplicación de soluciones hidratantes conteniendo AC, AG₃, BA o AOA; esta información puede ser utilizada para posteriormente ofrecer alternativas para incrementar la vida útil en esta especie nativa de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se cosecharon aproximadamente 300 espigas de cada una de las variedades 'Mexicano' y 'Perla' a las 8:00 a.m. en una huerta comercial de nardo en Cuahuchichinola, Mazatepec, Morelos, México (18°38'54", 99°22'56", 996 m) y se trasladaron en seco al laboratorio de Producción Agrícola de la Facultad de Ciencias Agropecuarias en la Universidad Autónoma del Estado de Morelos donde se seleccionaron espigas que no presentaran daños mecánicos visibles. La variedad 'Mexicano' tuvo en promedio 5 flores basales abiertas, en tanto que la variedad 'Perla' tenían aproximadamente 1 flor basal abierta. Las espigas fueron recortadas a 80 cm y se formaron seis lotes con 50 inflorescencias para cada tratamiento (tabla 1). Se realizaron experimentos individuales en cada variedad de nardo.

Tabla 1. Soluciones hidratantes evaluadas en nardo 'Mexicano' y 'Perla'.
Table 1. Hydrating solutions tested in 'Mexicano' and 'Perla' tuberose.

Tratamiento	Tiempo (h)	Sacarosa (%)	AG ₃ (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	AOA (mM)	HQC (mg L ⁻¹)	Ácido cítrico (%)
I	12	0	0	0	0	0	4
II	12	0	20	0	0	200	0
III	12	10	0	25	0	0	0
IV	12	2	0	0	0	200	4
V	12	0	20	10	5	0	0
Control (VI)	0	0	0	0	0	0	0

AG : Ácido gibérelico; BA: Benciladenina; AOA: Ácido amino-oxiacético; HQC: 8- citrato de hidroxiquinoleína.
AG₃: Gibberelic acid; BA (Benzyladenine), AOA: Aminoxyacetic acid; HQC: 8-hydroxyquinoline citrate.

Los tratamientos consistieron en colocar los 50 tallos de cada tratamiento en soluciones hidratantes que contenían diferentes concentraciones de Sac, AG₃, BA, AOA, HQC y AC durante 12 h (Cuadro 1). Adicionalmente se utilizó un grupo de 50 espigas de nardo como testigo las cuales se mantuvieron en agua destilada (Cuadro 1). Posteriormente se colocaron en probetas de vidrio de 1000 mL para evaluar su vida poscosecha algunas variables físicas, químicas y fisiológicas. En cada cultivar se utilizaron ocho tallos para medir variables no destructivas y seis tallos para variables destructivas efectuándose las mediciones cada dos días. El diseño experimental fue completamente al azar.

El número de flores abiertas y senescentes acumuladas se determinaron a partir del día en que las espigas fueron colocadas en probetas, el conteo se realizó de la parte basal hasta el ápice. El consumo de agua se determinó cada dos días, para esto se colocaron individualmente espigas de nardo en probetas de 1000 mL, donde se adicionó un volumen conocido de agua corriente de la llave. Después de evaluar el consumo de agua se realizó un cambio de agua. El peso fresco relativo se calculó al medir el peso de la espiga cada dos días y hasta que se consideró terminada su vida en florero, es decir cuando 50 % de las flores de la espiga estaban marchitas; el peso inicial de la espiga se determinó como el 100 %. La apariencia se evaluó con ayuda de una escala hedónica donde 5 fue excelente: las espigas tenían todas las flores turgentes y sin presencia de daños mecánicos visibles, 4 buena: la espigas presentaban un par de flores basales con inicios de marchitez y sin daños mecánicos, 3 regular: las flores basales presentaban marchitez y se observaban daños mecánicos en otras flores, 2 mala: más de dos pares de flores basales marchitas y más síntomas de daño mecánico y 1 se consideró senescente: cuando 50 % de las flores de la espiga presentaban marchitez y mayores síntomas de daños mecánicos. Los parámetros de color luminosidad (L*), ángulo matiz ($h = \arctan^{-1} b^*/a^*$) y cromaticidad ($C^* = (a^2 + b^2)^{1/2}$) fueron evaluados en cuatro flores por espiga con un espectrofotómetro manual (X-Rite 3290°, USA) (Neguerula, 2012).

La respiración se cuantificó mediante un sistema estático (Pérez *et al.*, 2015). Los azúcares totales se determinaron por la metodología de Antrona (Whitam *et al.*, 1971).

La determinación de la actividad enzimática de peroxidasa (EC 1.11.1.7; POD), catalasa (EC 1.11.1.6; CAT) y superóxido dismutasa (EC. 1.15.1.1; SOD) se realizó a partir de polvo de acetona, el cual se preparó al homogenizar pétalos frescos y se molieron con acetona fría (4 °C) en un Ultraturrax (IKA®, EUA) y el homogenizado se filtraba al vacío en un embudo Buchner, el residuo vegetal que se retenía en el papel filtro se utilizó para determinar la actividad enzimática. La extracción y cuantificación POD y CAT se determinó como lo indica Pérez *et al.* (2014) y de SOD como lo indican Beyer y Fridovich (1987). La actividad de las enzimas se reporta por mg de proteína, por lo que la determinación de proteína soluble fue necesaria y se realizó con el método de Bradford (1976). Estas variables fueron destructivas y se evaluaron en seis espigas, cada dos días después de aplicar las soluciones hidratantes.

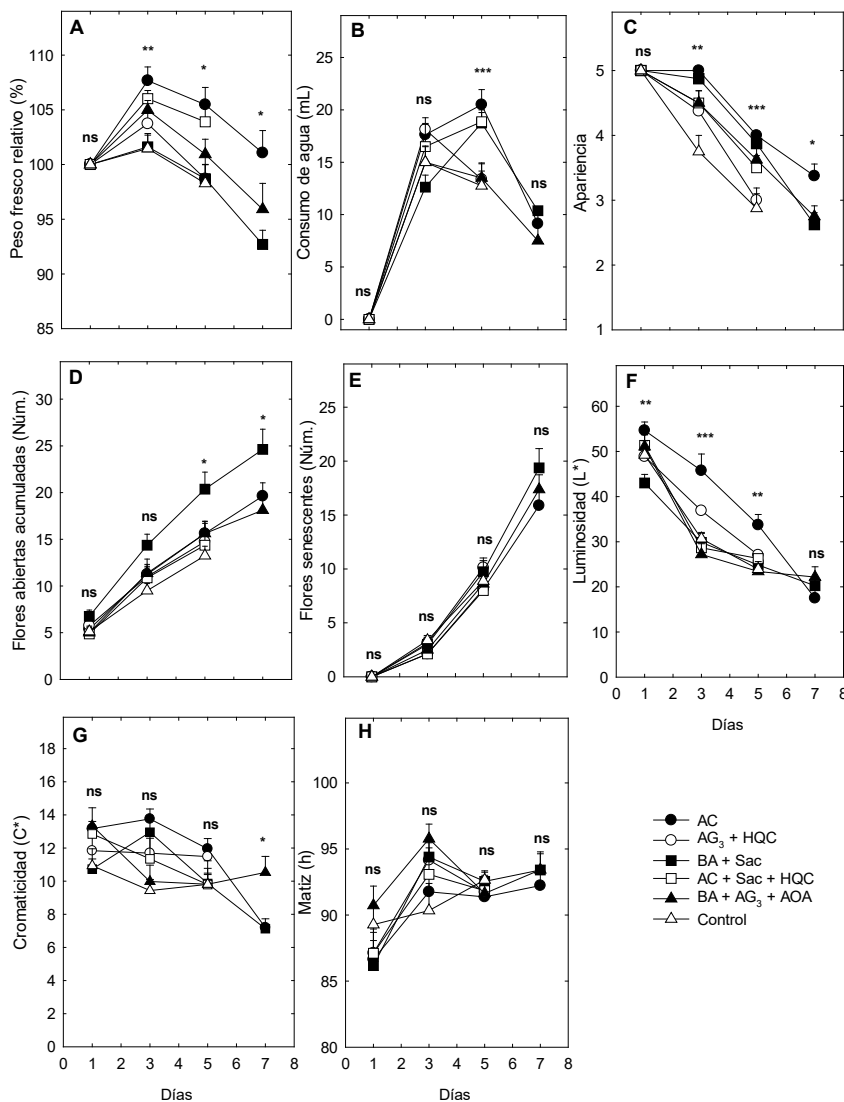
Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias de acuerdo con la prueba de Tukey con un 5% de probabilidad. Se utilizó el paquete estadístico SAS para los análisis de datos utilizando los comandos GLM, MEANS y CORR (Castillo, 2011).

RESULTADOS

'Mexicano'

El peso fresco relativo se incrementó significativamente al tercer día de evaluación, en las espigas donde se aplicó solución hidratante con AC, AC + Sac + HQC y BA + AG₃ + AOA se incrementó entre 5 y 8 %, mientras que el resto de los tratamientos entre 1 y 3 % (Figura 1 A). Entre el tercer y séptimo día, el peso fresco relativo disminuyó constantemente hasta valores cercanos al inicio del experimento, a excepción de las espigas hidratadas con AC, quienes mantuvieron un incremento de 2.0 % (Figura 1 A). El consumo de agua mayor se determinó al quinto día, donde las espigas pulsadas con AC, AC + Sac + HQC y BA + Sac absorbieron entre 18 y 20 mL espiga⁻¹, el resto de los tratamientos absorbieron significativamente menos agua, entre 12 y 14 mL espiga⁻¹ (Figura 1 B). Posteriormente el consumo de agua disminuyó significativamente en todos los tratamientos a 7 y 10 mL espiga⁻¹ (Figura 1 B).

La apariencia de las espigas de nardo fue buena durante cinco días cuando se hidrataron con AC o BA +



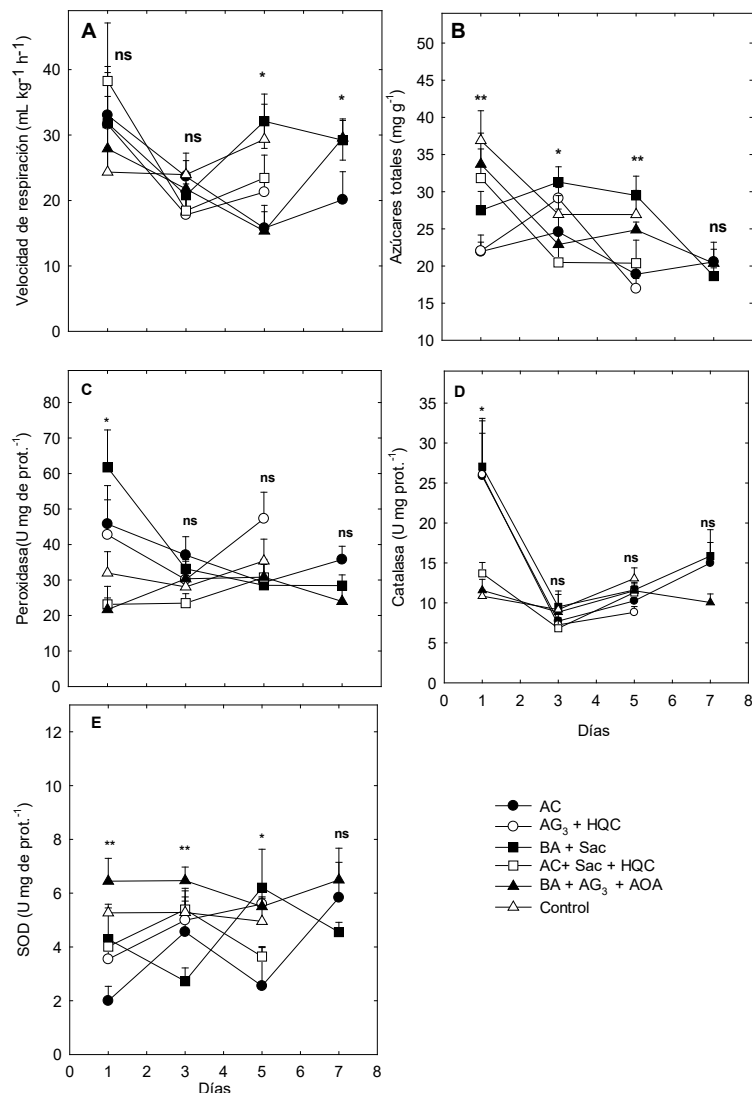
Sac, después de siete días, solo las espigas pulsadas con AC mantuvieron una apariencia cercana a buena (Figura 1 C). Las espigas testigo alcanzaron una calidad regular al quinto día de evaluación (Figura 1 C).

Al inicio del experimento las espigas de nardo en todos los tratamientos tuvieron en promedio 5.4 flores abiertas, alcanzado hasta 24.6 flores en promedio abiertas en las espigas hidratadas con BA + Sac después de siete días; y entre 18.1 y 19.6 flores abiertas en las espigas donde se aplicó la solución hidratante con AC o BA + AG₃ + AOA (Figura 1 D). Las espigas hidratadas con AG₃ + HQC ó AC + Sac +HQC, y testigo alcanzaron a abrir entre 15 y 16 flores por espiga al quinto día de evaluación (Figura 1 D). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el número de flores senescentes (Figura 1 E). Así al quinto día de evaluación se tenían entre 8 y 10 flores senescentes, y en séptimo días hasta 16 y 19 flores senescentes en las espigas pulsadas con AC, BA + Sac, y BA + AG₃ + AOA (Figura 1 E).

En los parámetros de color, la luminosidad fue el único parámetro donde se determinaron diferencias entre los tra-

tamientos evaluados, en general la luminosidad disminuyó en todos los tratamientos de valores entre L*= 43 y L*= 54 a valores entre L*= 17.5 y L*= 22.1 después de siete días (Figura 1 F). Las espigas hidratadas con AC mostraron significativamente menor velocidad en la disminución de la luminosidad (Figura 1 F). La cromaticidad mostró poco cambio durante la poscosecha y no se detectaron diferencias entre tratamientos, a excepción del último día de evaluación donde las espigas hidratadas con BA + AG₃ + HQC fueron menos opacas (Figura 1 G). El matiz se incrementó durante el periodo de evaluación, sin observarse diferencias significativas entre tratamientos (Figura 1 H).

La velocidad de respiración fue significativamente mayor al quinto día de evaluación en las espigas hidratadas con BA + Sac y testigo (Figura 2 A). Las espigas hidratadas con AC mostraron significativamente la menor respiración durante el periodo de evaluación (Figura 2 A). Los azúcares totales en las flores de las espigas tratadas con AC, fueron bajos durante todo el periodo de senescencia, entre 18 y 24 mg g⁻¹ de peso fresco (Figura 2 B). Las espigas testigo e hidratadas con BA +



AG₃ + AOA, AC+ Sac +HQC disminuyeron la concentración de azúcares de entre 31.8 y 39.5 mg g⁻¹ de peso fresco al inicio del experimento hasta entre 20.5 y 26.9 mg g⁻¹ de peso fresco después de 5 ó 7 días (Figura 2 B). Los tratamientos donde se mantuvo la concentración de azúcares totales entre 27.5 y 31.9 mg g⁻¹ de peso fresco en las espigas fue aquellas donde se aplicó BA + Sac y testigo (Figura 2 B).

La actividad específica de POD fue significativamente mayor al inicio del experimento (entre 42.7 y 61.7 U mg prot.⁻¹) en las espigas tratadas con BA + Sac, AC y AG₃ + HQC (Figura 2 C). No así, en las espigas testigo y las hidratadas con BA + AG₃ + AOA y AC + Sac + HQC donde la actividad específica se mantuvo entre 21.8 y 31.9 U g⁻¹ mg prot.⁻¹ (Figura 2 C). En los días posteriores la actividad específica de POD fue similar en todos los tratamientos manteniendo la tendencia a disminuir conforme avanza la senescencia (Figura 2 C). La actividad de CAT fue significativamente mayor al inicio del experimento en las espigas hidratadas con BA + Sac, AG₃ + HQC y AC, entre 25.38 y 27.6 U g⁻¹ de p.f, comparado con las espigas control, AC + Sac + HQC y BA + AG₃ + AOA (Figura 2 D). Posteriormente la actividad de CAT fue similar en todos los tratamientos, entre 7.2 y 14.9 U g⁻¹ de p.f, manteniendo una actividad constante durante la evaluación (Figura 2 D).

La actividad de SOD fue significativamente mayor en las espigas hidratadas con BA + AG₃ + AOA durante cinco días, similares tendencias mostraron las espigas testigo (Figura 2 E). El resto de los tratamientos mostraron de baja a mediana actividad durante los primeros cinco días, a excepción de las espigas hidratadas con BA + Sac quienes alcanzaron su máxima actividad en ese muestreo (Figura 2 E). Las espigas hidratadas con AC mostraron su mayor actividad en el séptimo día de muestreo (Figura 2 E).

'Perla'

El peso fresco relativo se incrementó posterior a la aplicación de los tratamientos evaluados, así en el séptimo día las espigas colocadas en solución hidratante de AC, AC + Sac + HQC alcanzaron un máximo de entre 22 y 23 % con respecto a los valores iniciales (Figura 3 A), las espigas tratadas con BA + AG₃ + AOA alcanzaron un máximo de 21 % después de cinco días (Figura 3 A), finalmente las espigas testigo o tratadas con BA + Sac alcanzaron un máximo de entre 12 y 14 % después de siete días (Figura 3 A). A pesar de estas diferencias numéricas el análisis de varianza no detectó diferencias significativas (Figura 3 A). El máximo consumo de agua fue significativamente mayor al tercer día de evaluación

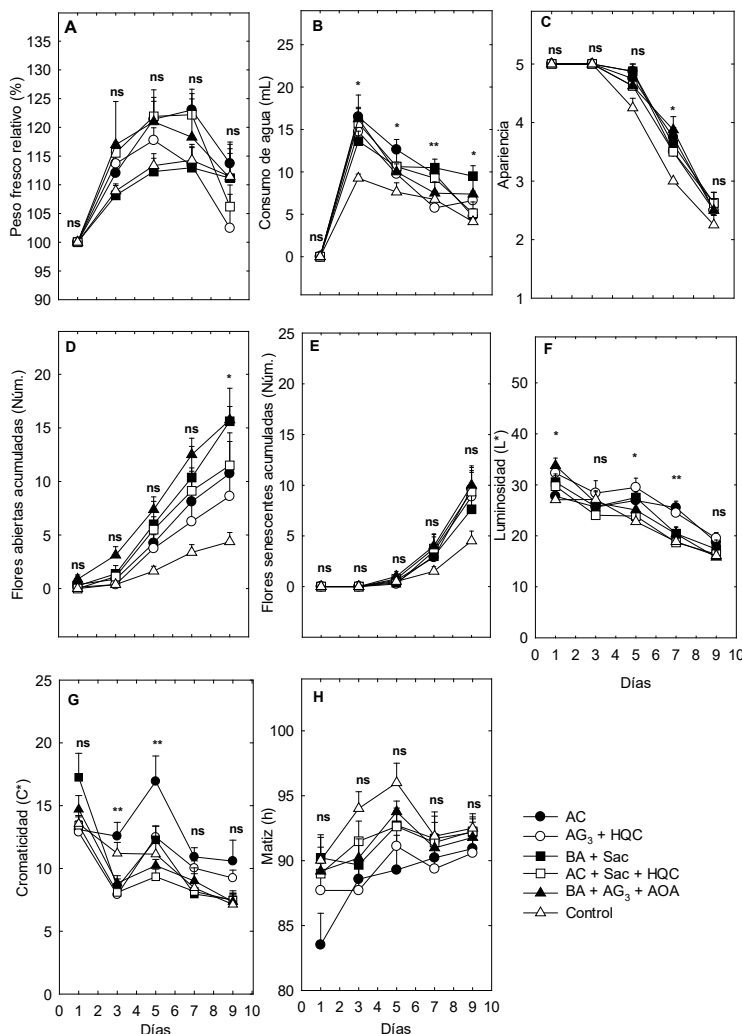


Figura 3. Comportamiento de las relaciones hídricas y calidad en inflorescencias de nardo: 'Perla' con diferentes soluciones hidratantes durante poscosecha. Cada punto representa la media de ocho observaciones y su error estándar. ns, *, ** y ***: no significativo, significativo al 0.05, 0.01 y <0.0001.

Figure 3. Behavior some variables of water relations and quality of tuberose spikes: 'Perla' with different hydrating solutions during postharvest. Each point represents the mean of eight observations and standar error. ns, *, ** and ***: not significant, significant at 0.05, 0.01 and <0.0001.

en las espigas donde se aplicaron las soluciones hidratantes conteniendo AC, BA, AG₃, Sac o AOA, entre 13.6 y 16.5 mL; no así en las espigas control donde el consumo no superó los 9.2 mL (Figura 3 B). En los días posteriores de evaluación, entre 5 y 9 días, las espigas tratadas con BA + Sac mantuvieron un consumo mayor de agua entre 9 y 10 mL (Figura 3 B).

La apariencia fue buena al séptimo día de evaluación en las espigas donde se aplicó solución hidratante con AC, BA, AG₃, Sac o AOA, mientras que las espigas testigo su calidad fue regular (Figura 3 C)

Las espigas testigo abrieron 4.3 flores en promedio durante los nueve días, en tanto que las espigas colocadas en BA + AG₃ + AOA ó BA + Sac, abrieron significativamente más flores, en promedio 15.6 flores; y las espigas pulsadas con AC, AC + Sac + HQC ó AG₃ + HQC abrieron entre 8.6 y 11.4 flores (Figura 3 D). El número de flores senescentes en las espigas donde se aplicó solución hidratante fue entre 7.6 y 10; mientras en las espigas testigo alcanzaron la senescencia en promedio 4.5; sin embargo, no se determinaron diferencias significativas (Figura 3 E).

La luminosidad de las flores de nardo disminuyó durante la poscosecha de entre L* =27 y L* = 33.3 al inicio del

experimento a entre L* = 15.8 y L* = 19.4, después de nueve días (Figura 3 F). Las espigas hidratadas con AG₃ + HQC ó AC mantuvieron por más tiempo los valores de L* (Figura 3 F). La cromaticidad disminuyó drásticamente del inicio al tercer día, posteriormente la cromaticidad mostró un incremento significativo y las espigas tratadas con AC mantuvieron el color más vivido (Figura 3 G). Finalmente, el matiz se incrementó durante poscosecha de valores entre h = 90 al inicio del experimento hasta h=96 en las espigas testigo (Figura 3 H). El resto de los tratamientos mostró un comportamiento similar y no se detectaron diferencias entre tratamientos (Figura 3 H).

La respiración de las espigas de nardo se incrementó en poscosecha en todos los tratamientos evaluados (Figura 4 A). Las espigas testigo alcanzaron los valores máximos después de cinco días, mientras que en el resto de los tratamientos se alcanzó su máxima producción después de siete días (Figura 4 A). Las espigas hidratadas con AG₃ + HQC y testigo mostraron significativamente la mayor velocidad de respiración, y las espigas pulsadas con BA + AG₃ + AOA, BA + Sac ó AC tuvieron la menor velocidad de respiración (Figura 4 A). Los azúcares totales en las flores de nardo perla disminuyeron durante la poscosecha, durante los primeros cinco días no se determinaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control; en los días posteriores, las espigas donde se aplicó AC tuvieron los valores menores de azúcares totales (Figura 4 B).

Las espigas testigo mostraron la mayor actividad de peroxidasa durante el periodo de evaluación (Figura 4 C). En tanto que las espigas hidratadas con AC, AG₃ + HQC y BA + Sac tuvieron menor actividad y constante durante el periodo de evaluación (Figura 4 C). La actividad de catalasa en las espigas de nardo 'Perla' un día después de aplicar la solución pulso mostró un gradiente: control, BA + AG₃ + AOA > BA + Sac y AC + Sac + HQC > AC y AG₃ + HQC, posteriormente a pesar de no detectarse diferencias entre tratamientos las espigas hidratadas con AC tuvieron la menor actividad con un ligero incremento al final de las evaluaciones (Figura 4 D). La actividad de SOD tuvo máximos de actividad durante el periodo de evaluación; así las espigas hidratadas con BA + AG₃ + AOA alcanzaron su máxima actividad después de tres días, en tanto que las espigas control, AC, AC + Sac + HQC alcanzaron su mayor actividad después de cinco días, y las espigas hidratadas con AG₃ + HQC alcanzaron la máxima actividad después de siete días, y notablemente las espigas hidratadas con BA + sacarosa, no mostraron ningún máximo (Figura 4 E).

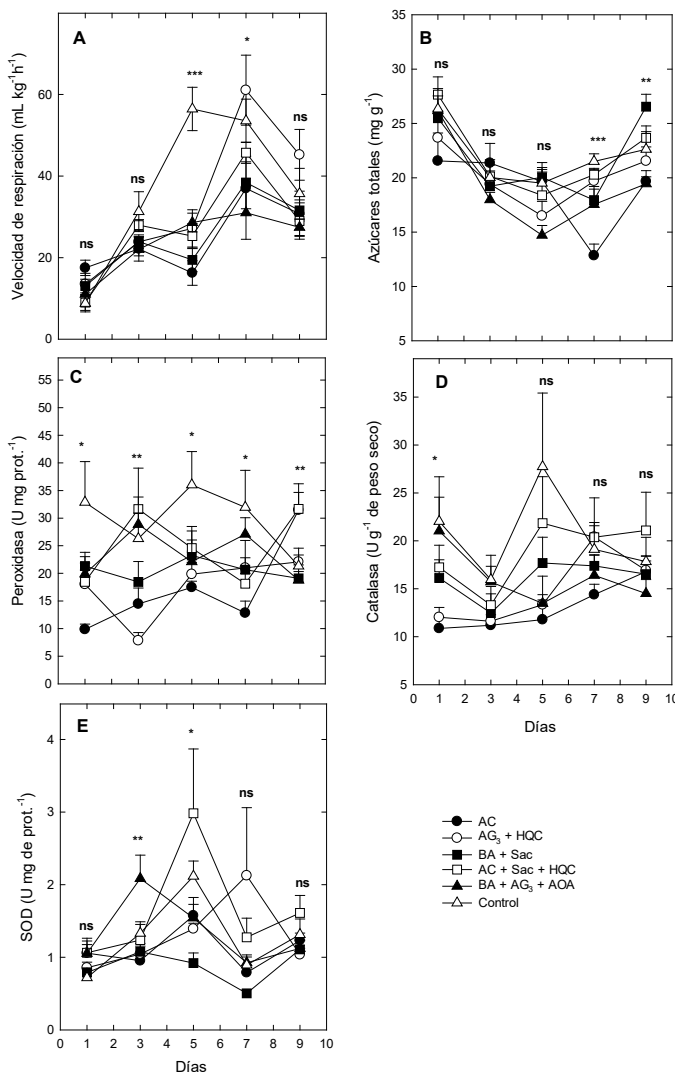


Figura 4. Comportamiento de algunas variables fisiológicas y bioquímicas en inflorescencias de nardo: 'Perla' con diferentes soluciones hidratantes durante poscosecha. Cada punto representa la media de seis observaciones y su error estándar. ns, *, ** y ***: no significativo, significativo al 0.05, 0.01 y <0.0001.

Figure 4. Behavior of some physiological and biochemical variables *Polianthes* spikes: 'Perla' with different hydrating solutions during postharvest. Each point represents the mean of six observations and standar error. ns, **, ***, not significant, significant at 0.05, 0.01 and <0.0001.

DISCUSIÓN

Reid (2009) indica que una vida larga en las flores de corte depende de forma casi absoluta de un constante suministro de agua, si esta se interrumpe se presenta un marchitamiento rápido de los pétalos y hojas. En el presente experimento la aplicación de solución hidratante conteniendo AC ó BA + Sac ó HQC incrementó el consumo de agua y el peso fresco relativo en ambas variedades (Figuras 1 A, B y 2 A, B). Choudhury y Barooah (2011) sugieren que el ácido cítrico ayuda a disminuir el crecimiento bacterial y previene el bloqueo vascular, por lo que ayuda a incrementar la vida en florero y mejora la turgencia de las espigas de nardo. Wawrzyncza y Goszczynska (2003) indican que la aplicación de BA en flores de corte mejora el consumo de agua. Longo *et al.* (1978) indican que la BA favorece el consumo de agua en cotiledones de melón, al incrementar los solutos y la plasticidad de la pared celular.

La apariencia buena (entre 5 y 7 días) y el mayor número de flores abiertas en ambas variedades al aplicar las soluciones hidratantes con BA + Sac ó BA + AG₃ + AOA, son consecuencia de una mejor hidratación; en específico la apariencia mostró cierta asociación positiva y significativa con el consumo de agua $r = 0.60^{***} - 0.43^{***}$. Hutchinson *et al.* (2003) y Uthairatanakij *et al.* (2007) e indican que la aplicación de BA en dosis de 25 mg L⁻¹ o entre 10 y 20 mM en nardo, mejoran la apertura de flores en nardo debido a un mejor balance hídrico y un efecto protector de las citocininas en la turgencia celular probablemente asociado a una disminución de salida de iones. Pérez *et al.* (2015) reportan una apariencia regular después de 5 días en flores de nardo 'Perla', en el presente trabajo las soluciones hidratantes evaluadas alcanzaron buena apariencia hasta por siete días.

La luminosidad y la cromaticidad fueron los parámetros de color que mostraron diferencias entre tratamientos, por lo que se pueden considerar como variables para posteriormente determinar el efecto de tratamientos en la calidad de nardo. En ambas variedades la luminosidad y cromaticidad mostraron cierta asociación positiva significativa con la apariencia, $r = 0.47^{***} - 0.67^{***}$ en 'Mexicano' y $r = 0.20^{***} - 0.63^{***}$ en 'Perla'. Las espigas donde se aplicó AC mantuvieron el color con mayor tendencia al blanco y menos opaco en ambas variedades; como se ha mencionado anteriormente una mejor hidratación en las flores donde se aplicó AC ayuda a mantener estos parámetros de color de la luminosidad y cromaticidad.

La respiración puede utilizarse como un índice excelente para predecir la duración en florero en las flores de corte, ya que, si hay una velocidad de respiración alta, la disminución en calidad del producto será más rápida (Finger *et al.*, 2016). Los resultados indican que las soluciones hidratantes retrasaron la aparición del pico climatérico en dos días en 'Mexicano' y que el pulsado con BA + AG₃ + AOA o el AC reducen la velocidad de respiración en ambas variedades. Wawrzynczak y Goszczynska (2003) indican que la aplicación de citocininas en flores de corte reduce la velocidad de respiración. Sin embargo, no se reporta el mecanismo de acción

donde la BA o el AC reduzcan la velocidad de respiración. Aspecto, interesante es que las espigas que fueron hidratadas con AC, los azúcares totales se mantuvieron en los niveles menores y las espigas tratadas con BA + Sac, mostraron una mayor concentración de azúcares totales (Figura 2 B y 4 B). Lo anterior sugiere que en las espigas donde se aplicó AC, probablemente fue el sustrato utilizado para respiración y en el caso de las espigas donde se aplicó BA + Sac, el azúcar adicionado mantuvo por más tiempo los niveles de carbohidratos solubles en los pétalos. Es necesario en posteriores trabajos determinar los cambios de los azúcares en los pétalos y su traslocación con otros órganos de la planta, así como la relación con la velocidad de respiración.

Durante la senescencia de flores como *Gladiolus*, *Hemerocallis* y *Chrysanthemum* se han reportado altos niveles de radicales libres y H₂O₂ en los pétalos; y se indica que contribuyen en acelerar los procesos de senescencia (Ahmad y Tahir, 2016). Las enzimas SOD, CAT y POD están involucradas en el atrapamiento de radicales libres de las plantas (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2020). En el presente experimento en las espigas de 'Mexicano' la actividad específica de CAT y POD fueron altas al inicio del experimento y posteriormente disminuyeron drásticamente, en tanto que en 'Perla' la actividad específica de CAT y POD alcanzaron máximos días después de aplicar las soluciones hidratantes (Figura 4 C y D), esto se atribuye a que las flores de 'Mexicano' estaban en una etapa más avanzada de apertura floral que 'Perla'. En general, las espigas hidratadas con AC y BA mantuvieron la menor actividad en 'Perla', lo que sugiere que CAT y POD se mantuvieron en niveles bajos ya que los radicales libres no estaban en niveles que indujeran al estrés oxidativo. González-Fuentes *et al.* (2020) sugieren que el incremento en el contenido de H₂O₂ ocasiona una mayor síntesis de la enzima CAT para evitar el daño oxidativo.

Finalmente, la actividad de SOD en las espigas de 'Mexicano' y 'Perla' alcanzaron máximos de actividad; donde las espigas control mantuvieron los valores mayores y las espigas donde se aplicó la solución hidratante conteniendo AC ó BA mantuvieron los valores menores. En flores de corte, se reporta que la actividad específica de SOD disminuye constantemente en los pétalos, perdiendo la capacidad de defensa con radicales libres y se incrementan la degradación de membranas en los tejidos florales y eventualmente ocasiona el marchitamiento (Bailly *et al.*, 2001). En *Phaseolus vulgaris* el estrés por cadmio inhibe la actividad de SOD atribuido a un incremento en H₂O₂ (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2020). Singh *et al.* (2008) mencionan que varios autores han reportado que la BA incrementa la vida poscosecha de las flores al mejorar la estabilidad de la membrana, retrasar la peroxidación de lípidos de membrana y disminución de la fuga de iones; sin embargo, actualmente no se conocen los mecanismos de acción. No se tienen reportes de los efectos de AC sobre los procesos enzimáticos en senescencia, por lo que en trabajos posteriores es importante abordarlos con mayor profundidad.

CONCLUSIONES

Las soluciones hidratantes conteniendo ácido cítrico (4 %) o benciladenina + Sac (25 mg L⁻¹ + 10 %) favorecen los procesos físicos de consumo de agua, apariencia y componentes del color; fisiológicos como una mejor menor velocidad de respiración y bioquímicos con menor actividad de las enzimas antioxidativas de CAT, POD y SOD, por lo que pueden ser utilizados para incrementar la vida útil de nardo 'Mexicano' y 'Perla'.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor (SLFS) agradece al CONACYT por la beca para estudios de maestría, de donde se deriva este trabajo.

REFERENCIAS

- Abbasi, J. y M. A. Hassanpour. 2011. Study on prolonging the base life of tuberose cut flowers (*Polianthes tuberosa* L.). South West J. Horti. 2: 157-165.
- Ahmad, S. S. y Tahir, I. 2016. How and why of flower senescence: understanding from models to ornamentals. Indian Journal of Plant Physiology 21: 446-456.
- Arief, Z. M. 2016. Postharvest Physiology and Handling of cut Flowers. San Bernardino, Scholar's Press.
- Bailly, C., Corbineau, F. y Van Doorn, W. G. 2001. Free radical scavenging and senescence in *Iris* tepals. Plant Physiology and Biochemistry 39: 649-656.
- Barba R. G., Rodríguez, J. M. D., Castañeda, M. C. S., Rodríguez, A., Van Tuyl J. M. y Tapia, C. E. 2012. Mexican geophytes I. The genus *Polianthes*. Floriculture and Ornamental Biotechnology 6: 122-128.
- Beyer, F. W. y Fridovich, I. 1987. Assaying for superoxide activity: some large consequences of minor changes in conditions. Analytical Biochemistry 161: 559-566.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254.
- Castillo, L. E. C. 2011. Introducción al SAS® para Windows. Chapingo, Universidad Autónoma Chapingo.
- Choudhury T. M. y Barooah L. 2011. Effect of Pulsing and Different Holding Solutions on Flowers quality and Vase life of Tuberose (*Polianthes tuberosa* Linn) cv. Calcutta Double. Indian Journal of Hill Farming 24(1): 31-33.
- Dias, T. G. M., Finger, F. L. y Barbosa, J.G. 2005. Fisiología poscolegita de flores de corte. Ornamental Horticulture 11(2): 89-99.
- Finger, F. L., Silva, T. P., Araujo, F. F. y Barbosa, J.G. 2016. Postharvest quality of ornamentals plants. En: Postharvest ripening physiology of crops. A. Pareek (Ed.), pp. 81-108. CRC Press, Boca Raton, USA.
- González, V. M. E. 2016. *Polianthes tuberosa* L.: Revisión de sus aspectos filogenéticos, morfológicos y de cultivo. Cultivos Tropicales 37: 120-136.
- González-Fuentes, J. A., Jiménez-López, D., Sandoval-Rangel, A., Hernández-Pérez, A., Medrano-Macía, J. y Preciado-Rangel, P. 2020. Efecto de las enmiendas minerales sobre el contenido mineral y antioxidantes en frutos de frambuesa. Biotecnia 22 (1): 48-55.
- Gutiérrez-Martínez, P.B., Torres-Móran, M. I., Romero-Puertas, M.C., Casas-Solís, J., Zarazúa-Villaseñor, P., Sandoval-Pinto, E. y Ramírez-Hernández, B. C. 2020. Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress. Biotecnia 22(2): 110-118.
- Hutchinson, M. J., Chebet, D. K. y Emongor, V. E. 2003. Effect of Accel, sucrose and silver thiosulfate on the water relations and postharvest physiology of cut tuberose flowers. African Crop Science Journal 11:279-287.
- Longo, G. P., Longo, C. P., Rossi, G., Vitale, A. y Pedretti, M. 1978. Variations in carbohydrate and lipid content and in osmotic potential of watermelon cotyledons treated with benzyladenine. Plant Science Letters 12: 199-207.
- Maree, J. y Van-Wik, B. E. 2010. Cut flowers of the world. A Comprehensive reference for growers and florists. Timber Press, Oregon, USA.
- Neguerula, A. I. 2012. Is the color measured in food the color that we see? En: Color in food. Technological and psychophysical aspects. Caivano, J.L., Buera M. del P. (eds.) pp: 81-91. CRC Press, Buenos Aires, Argentina.
- Pérez, A.G.A., Alia, T. I., Valdez, L.A.A., Colinas M. T. L., López, V. M. y Sainz, M. de J. A. 2014. La refrigeración en húmedo y seco afecta la vida poscosecha de flores de corte de lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) 'ABC Blue Rim'. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 5(7): 1247-1260.
- Pérez, A.G.A., Alia, T. I., Colinas, L. M. T., Sainz, A. M. J. y Álvarez, V. J. E. 2015. Aplicación de 1-metilciclopropeno en inflorescencias de nardo (*Polianthes tuberosa* L.) en poscosecha. Acta Agrícola y Pecuaria 1(1): 29-36.
- Pérez, A. G. A., I. Alia T., Colinas M.T.L., Valdez L.A.V. y Pelayo C.Z. 2019. Postharvest physiology and technology of the tuberose (*Polianthes tuberosa* L.): an ornamental flower native to Mexico. Horticulture, Environment and Biotechnology 60: 281-293.
- Reid, M. S. 2009. Poscosecha y manejo de las flores de corte. HortiTecnica, Bogotá, Colombia.
- SIAP. 2020. Cierre de la producción agrícola por cultivo (1980 - 2018). [Consultado el 22 de marzo de 2020]. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Singh, A., Kumar, J. y Kumar, P. 2008. Effects of plant growth regulators and sucrose on postharvest physiology, membrane stability and vase life of cut spikes of gladiolus. Plant Growth Regulators 55: 221-229.
- Trueblood, E.W. E. 1973. "Omioxochitl" – the Tuberose (*Polianthes tuberosa*). Economic Botany 27: 157-173.
- Uthairatanakij, A., Jeenbutung, J., Buanong y M., Kanlayanarat, S. 2007. Effect of thidiazuron pulsing on physiological changes of cut tuberose flower (*Polianthes tuberosa* L.). Acta Horticulturæ 755: 477-480.
- Vázquez, G. L. M. 2004. Nardo (*Polianthes* spp.) y amolli (*Manfreda* spp.). Recursos fitogenéticos ornamentales de México. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.
- Whitam, F. F., Blaydes, D. F. y Devlin, R. M. 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Wawrynczak, A. y Goszczynka, D. 2003. Effect of pulse treatment with exogenous cytokinins on longevity and ethylene production in cut carnations (*Dianthus caryophyllus* L.). Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 11: 77-88.



Efecto de diferentes proporciones de luz LED azul:roja en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

Effect of different blue:red LED light ratios on habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) plants

Jorge Enrique Mendoza-Paredes^{1*}, Ana María Castillo-González¹, Edilberto Avitia-García¹, Luis Alonso Valdéz-Aguilar², María del Rosario García-Mateos¹

¹ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Chapingo, Estado de México, México.

² Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro 1923. CP. 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila. México.

RESUMEN

El chile habanero es el cultivo hortícola de mayor importancia económica en la península de Yucatán. Este podría desarrollarse en ambiente controlado con iluminación LED y permitiría tener una producción continua, con un aumento exponencial de rendimiento y estar libre de plagas y enfermedades. Los objetivos fueron evaluar el efecto de cinco proporciones de luz LED azul:roja y un testigo fluorescente sobre crecimiento en planta, concentración de pigmentos fotosintéticos, compuestos fenólicos y nutrimental en hoja; germinación de polen, grosor de hoja, anatomía de ovario y antera de chile habanero 'Mayan Ba'alché' bajo condiciones controladas de crecimiento. Los resultados mostraron que los tratamientos no indujeron un efecto en crecimiento de planta. La luz roja favoreció el rendimiento de frutos y frecuencia estomática. La luz roja monocromática favoreció la concentración de pigmentos fotosintéticos, Mg y Mn e indujo menor concentración de P y Cu. La luz azul monocromática favoreció la concentración de compuestos fenólicos. El testigo indujo mayor concentración de K entre algunos tratamientos LED e incrementó la germinación de polen y el grosor de hoja al igual que la luz azul monocromática. La anatomía de los óvulos en ovarios y el polen en anteras no presentaron ningún efecto por los tratamientos.

Palabras clave: *Capsicum chinense* Jacq., chile habanero, luz LED, ambiente controlado.

ABSTRACT

Habanero pepper is the most economically important horticultural crop in the Yucatan peninsula. This crop under a controlled environment with LED lighting, would allow continuous production, with an exponential increase in yield, and be free of pests and diseases. The objectives were to evaluate the effects of five blue:red LED light ratios and a fluorescent control on plant growth, photosynthetic pigments, phenolic compounds and nutrients concentration in leaf; pollen germination, leaf thickness, ovary anatomy and anther of habanero pepper 'Mayan Ba'alché' grown under controlled conditions. The results showed that the treatments did not induce an effect on plant growth. Red light favored fruit yield and stomatal frequency. Monochromatic red light favored the concentration of photosynthetic pigments, Mg and Mn and induced a lower P and Cu concentration. Monochromatic

blue light favored the concentration of phenolic compounds. The control induced a higher K concentration among some LED treatments and increased pollen germination and leaf thickness as well as monochromatic blue light. The anatomy of ovules in ovaries and pollen in anthers has no effect of the treatments.

Keywords: *Capsicum chinense* Jacq., habanero pepper, LED light, controlled environment.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una planta anual de tipo arbustivo (Lim, 2013) nativa de las tierras bajas de la cuenca amazónica, donde se dispersó en la época prehispánica a la cuenca del Orinoco y otras regiones de Perú, las Antillas y finalmente arribó a la Península de Yucatán (Trujillo, 2018). Actualmente este es el cultivo hortícola de mayor importancia económica para la península de Yucatán en México (Ruiz-Lau *et al.*, 2011); desde 2010 posee la denominación de origen en esta región (CICY, 2016). El fruto posee diversas propiedades nutraceuticas y medicinales (Lim, 2013), es usado también en la industria alimentaria, farmacéutica y militar (Ruiz-Lau *et al.*, 2011).

Debido a esto, ha surgido la necesidad de realizar investigación de su cultivo en ambiente controlado con iluminación LED para analizar el comportamiento como una alternativa de producción, ya que con este sistema se elimina la aparición de plagas y enfermedades, por lo tanto, la obtención de un producto orgánico libre de plaguicidas e inocuo a la salud humana. Otra ventaja sería su producción continua, sin estacionalidad de cultivo, por el control de las variables ambientales y de la fuente de luz, lo cual en su conjunto trae un incremento exponencial de la producción (Kozai y Niu, 2016).

Actualmente no existe investigación de esta especie bajo estas condiciones de crecimiento; sin embargo, se han realizado investigaciones por parte de Gangadhar *et al.* (2012) en chile picante cv. Cheonyang y Naznin *et al.* (2019) en pimiento dulce enano cv. Redstart, en ambas investigaciones existieron diferencias entre los tratamientos de luz LED azul y roja que evaluaron, respecto a las variables del crecimiento como altura de planta, área foliar, peso fresco de la parte aérea, número de frutos por planta y en los pigmentos fotosintéticos en hoja como clorofila a, b, total a/b y carotenoides.

*Autor para correspondencia: Jorge Enrique Mendoza Paredes
Correo electrónico: jmendezaparedes@hotmail.com

Recibido: 9 de mayo de 2020
Aceptado: 24 de agosto de 2020

Con base en la información anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diferentes proporciones de luz LED roja y azul sobre crecimiento, concentración de pigmentos fotosintéticos, fenoles totales y nutrimental en hoja; así como determinar si los tratamientos influyen en la germinación de polen, grosor de hoja, frecuencia estomática, anatomía de ovario y antera de chile habanero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cámara y gabinetes de crecimiento

Se realizó una adaptación de una cámara de crecimiento a partir de un cuarto frío (TORREY®, MEX), con medidas interiores de 2.76 m x 2.76 m x 1.90 m (ancho, largo y altura), las modificaciones internas de la cámara de crecimiento se basaron en el diseño de Katagiri *et al.* (2015), se reguló la temperatura ambiental y humedad relativa con un equipo de aire acondicionado portátil (LG® modelo LP1017WSR 10200 BTU, KOR) y un deshumidificador (Whirlpool® modelo WAD200 5Q 20L/24 h, USA). En el interior de esta cámara, se diseñaron seis gabinetes de crecimiento a partir de un anaquel metálico de 0.3 m x 0.85 m x 1.85 m (ancho, largo y altura) a los cuales se les añadieron paredes de placas de unicele de 2 cm de grosor forradas con papel aluminio para tener máxima reflexión de la luz en el interior y para aislar los tratamientos uno de otro.

Tratamientos con diferentes proporciones de luz LED azul y roja

Las luminarias que se utilizaron fueron hechas a mano, compuestas por perfiles de aluminio de 5 cm x 85 cm (ancho x largo) en donde se anclaron focos LED azul y rojos (Longniu® modelo GR-DB015 de 4 watts, CHN) y las lámparas fluorescentes (Osram® modelo Ocron/F017 de 17

watts, DEU). Las luminarias fueron colocadas debajo de la parte superior de cada uno de los gabinetes de crecimiento. Los tratamientos consistieron en un testigo fluorescente (4 lámparas) y en los tratamientos A0 %:R100 % (A0) con 24 focos LED rojos, A34.5 %:R65.5 % (A34.5) con 18 focos LED rojos y 6 azules, A57.1 %:R42.9 % (A57.1) con 12 focos LED rojos y 12 azules, A76 %:R24 % (A76) con 6 focos LED rojos y 18 azules, A100 %:R0 % (A100) con 24 focos LED azules. Se utilizaron dos perfiles por tratamiento (12 focos LED por perfil) y el testigo con cuatro perfiles (1 lámpara fluorescente por perfil). La densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y las propiedades físicas del espectro electromagnético de los tratamientos se midió con un espectroradiómetro (Apogee instruments® modelo SS-110, EUA) donde se tomaron 330 mediciones sobre el área de cultivo (66 cm x 20 cm = 1320 cm²), que fue la superficie en relación a la parte inferior del gabinete, donde las plantas tuvieron su desarrollo durante el transcurso del experimento, y así verificar que los tratamientos tuvieran la misma densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF). Se realizó un análisis estadístico de las variables físicas de los tratamientos (Tabla 1) para asegurar que las intensidades de luz entre tratamientos LED fueran iguales y las proporciones de luz azul y roja fueran diferentes; además de verificar el pico de longitud de onda (nm) e intervalo de la luz LED presente en los tratamientos. Se estableció un fotoperiodo para todos los tratamientos de luz de 15 h por día durante 145 días después del trasplante.

Material vegetal

Se utilizaron semillas de chile habanero 'Mayan Ba'alché' del CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán), las cuales previamente se sembraron en un semi-

Tabla 1. Propiedades físicas de los tratamientos con diferentes proporciones de luz LED azul y roja en chile habanero cultivado bajo condiciones controladas.

Table 1. Physical properties of treatments with different blue and red LED light ratios on habanero pepper grown under controlled conditions.

	Tratamientos ^a					
	FL	A0	A34.5	A57.1	A76.0	A100
PrA	Testigo	A0 %	A34.5 %	A57.1 %	A76 %	A100 %
PrR	Testigo	R100 %	R65.5 %	R42.9 %	R25.8 %	R0 %
Dtot	119.1±0.6b	241.5±3.1a	241.4±3.3a	244.4±2.4a	241.4±1.8a	243.8±2.5a
LID	6.4±0.0b	13.0±0.2a	13.0±0.2a	13.2±0.1a	13.0±0.1a	13.2±0.1a
λA	-	-	457±0b	457±0a	457±0b	457±0b
%DA	-	-	34.5±0.6d	57.1±0.3c	76.0±0.3b	100.0±0.0a
λR	-	636±0b	635±0c	637±0a	636±0b	-
%DR	-	100.0±0.0a	65.5±0.6b	42.9±0.3c	24.0±0.3d	-

^aMedias con letras iguales en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). FL= fluorescente con un intervalo de 416nm – 715nm (testigo); A= Luz LED azul; R= Luz LED roja; PrA= Proporción luz azul; PrR= Proporción luz roja; Dtot= Densidad de flujo de fotones fotosintéticos total de tratamiento ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$); LID= Luz integral diaria ($\text{mol m}^{-2} \text{d}^{-1}$); λA= Pico de longitud de onda (nm) color azul; %DA= Porcentaje de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de luz azul (%); λR = Pico de longitud de onda (nm) color rojo; %DR= Porcentaje de densidad de flujo de fotones fotosintéticos de luz roja (%).

llero de 200 cavidades, se colocó una semilla por cavidad a una profundidad de 1 cm en una mezcla de turba rubia (Pro mix®, CAN) y perlita (Agrolita®, MXN) en proporción 3:1 v/v, los semilleros se cortaron para tener 80 cavidades (4 filas x 20 columnas) y tener una charola por tratamiento. Una vez sembradas, se colocaron en un laboratorio donde tuvieron luz solar incidente a través de una ventana durante la duración del día y fueron regadas con agua potable (pH 7.1 y CE 0.42 dS m⁻¹). La temperatura ambiental (día 25.8±0.2 °C/noche 22.6±0.1 °C) y la humedad relativa (día 51.5±0.6 %/noche 58.6±0.6 %); se registraron con un datalogger (Extech instruments® modelo RH10, USA). A los 17 días en estas condiciones, al inicio del desarrollo, las plántulas contaban con dos cotiledones y dos hojas; en este momento las charolas con las plántulas se trasladaron a la cámara de crecimiento, para iniciar los tratamientos con luz. En estas nuevas condiciones las plántulas crecieron por 35 días a una temperatura ambiental (°C) promedio (día 28.2±0.1/noche 25.3±0.1) y humedad relativa (%) promedio (día 56.2±0.5/noche 77.1±0.5). El riego se hizo diariamente a cada una de las charolas con 300 mL de la solución de Hoagland modificada a 1/5 de su concentración (Bojórquez-Quintal *et al.*, 2014) con pH de 6.8 y CE de 1.35 dS cm⁻¹, donde se abastecieron los macronutrientes de la forma siguiente: 1.2 mM KNO₃, 0.8 mM Ca(NO₃)₂, 0.2 mM KH₂PO₄, 0.2 mM MgSO₄ y los micronutrientes se abastecieron con la mezcla Tradecorp® AZ (0.065g L⁻¹).

Trasplante

Una vez que transcurrieron 35 días, se obtuvieron plántulas adecuadas para trasplante, se eligieron tres por tratamiento y se trasplantó una por maceta, las cuales conservaron los mismos tratamientos de luz (Tabla 1) una vez trasplantadas, se mantuvo así por 145 días después del trasplante (ddt). Se ocuparon tres macetas de 5 L por tratamiento con una mezcla de turba:perlita (3:1), turba rubia (Pro mix®, CAN) y perlita (Agrolita®, MXN) y se regaron diariamente con 1 L de la solución nutritiva de Hoagland (Hoagland y Arnon, 1950) a 100 % de concentración de macronutrientes con un pH de 5.8 y CE de 1.33 dS cm⁻¹, los micronutrientes se abastecieron con la mezcla Tradecorp® AZ (0.065g L⁻¹). La temperatura ambiental promedio fue (día 26.7±0.1 °C/noche 23.9±0.1 °C) y la humedad relativa promedio (día 66.1±0.2 %/noche 82.3±0.2 %), éstas se registraron cada minuto con el promedio de tres datalogger (Extech instruments® modelo RH10, USA), los cuales se colocaron uno por gabinete a nivel de copa de la planta en los tratamientos A76 %:R24 %, A34.5 %:R65.5 % y el testigo. La temperatura promedio de la solución nutritiva se midió con un termómetro infrarrojo (Extech instruments® modelo 42530, USA) y tuvo un valor de 26.2±1.3 °C. La concentración promedio de CO₂ se midió con un medidor portátil de CO₂ ambiental (Extech instruments® modelo CO250, USA) y tuvo una media de 404±52 ppm. Durante el crecimiento de la planta se realizaron podas de chupones y ramas para tener una planta con dos tallos, además se realizaron podas de hojas en la parte inferior de la planta con el fin de evitar un sombreado excesivo entre éstas.

También se realizaron polinizaciones manuales con un pincel para aumentar el porcentaje de amarre de frutos.

Variables de crecimiento de la planta

A los 145 (ddt), las plantas se cosecharon y se determinó la altura de planta (cm), el peso fresco de tallo y de hoja (g planta⁻¹), con una balanza de precisión (Ohaus® Scout Pro, USA), el peso fresco de la parte aérea (g planta⁻¹) se estimó con la suma del peso fresco del tallo y de las hojas. El diámetro de tallo (mm) se midió con un vernier digital (Truper®, MEX); el área foliar (cm² planta⁻¹) se determinó con un integrador de área foliar LI-3100 (LICOR®, USA) y se calculó el índice de área foliar con base en la fórmula [área foliar (cm²)/área de cultivo (cm²)]. La parte aérea de la planta se secó en una estufa de aire forzado (BINDER® modelo FED 115, DEU) por 48 horas a 65 °C y se registró el peso seco de tallo y hoja (g planta⁻¹), ambos por separado, con una balanza de precisión (Ohaus® Golden series, USA), el peso seco de la parte aérea (g planta⁻¹) se determinó mediante la suma del peso seco del tallo y de las hojas. Los frutos se cosecharon a los 109 y 145 ddt y se contabilizó el total por tratamiento. La frecuencia estomática (número de estomas por mm²) se determinó mediante la aplicación de barniz transparente sobre el envés de la hoja; posteriormente, se despegó la calca que se formó en la hoja y se colocó en un portaobjetos para la contabilización de los estomas con un microscopio (Carl Zeiss® Axiostar, DEU), con aumento de 40 x. En cada una de las variables medidas se utilizaron tres repeticiones por tratamiento, excepto para la frecuencia estomática donde se tuvieron 10 repeticiones.

Concentración de pigmentos fotosintéticos en hoja

Las concentraciones de clorofila a, b y total (mg g⁻¹ de peso fresco), proporción de clorofila a/b y concentración de carotenoides (mg g⁻¹ de peso fresco) se determinaron mediante la metodología descrita por la AOAC (1980). Estas variables se determinaron en hojas fuente (de reciente maduración), completamente desarrolladas, recién cortadas y utilizando tres hojas por planta por tratamiento.

Compuestos fenólicos totales en hoja

Se tomaron 2 g de hojas fuente completamente desarrolladas recién cortadas, las cuales se cortaron finamente y se les adicionó 10 ml de MeOH al 80 % (v/v), posteriormente se homogeneizó mediante sonicación por 15 minutos a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 24 h en refrigeración y oscuridad. Pasado este tiempo, se tomó 0.1 mL del extracto metanólico previamente preparado, se agregó 0.1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu 0.2 N, 4.5 ml agua destilada y 0.3 ml de Na₂CO₃ 2 % (p/v), esta mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 2 h. Posteriormente se tomaron lecturas de absorbancia del sobrenadante en un espectrofotómetro Genesys 10s (Thermo Fisher Scientific, USA) a una longitud de onda de 765 nm. La concentración de compuestos fenólicos se calculó a partir de una curva estándar preparada con ácido gálico y se expresó en mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de peso fresco

(mg EAG 100 g⁻¹ PF) de acuerdo con el método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se utilizaron tres repeticiones de cada tratamiento.

Concentración nutrimental en hojas

Se determinaron P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, B y Cu en un espectrofotómetro de Emisión Atómica de Plasma por Inducción Acoplada (ICP-AES) (VARIAN modelo Liberty II, USA); la concentración de N se determinó con el método micro-Kjeldahl (Alcántar y Sandoval, 1999). Se utilizaron para las determinaciones 0.1 g de hojas fuente completamente desarrolladas previamente secas en una estufa de aire forzado (BINDER® modelo FED 115, DEU) por 48 horas a 65 °C. Para la determinación de los elementos se utilizaron tres repeticiones por tratamiento.

Variables anatómicas y germinación de polen

A los 106 ddt, se realizaron cortes anatómicos longitudinales de flores en anthesis y cortes transversales de hojas completamente desarrolladas. Por tratamiento se utilizaron cinco flores y cinco hojas. En el caso de las flores, se eliminaron los pétalos y posteriormente se seccionó el ovario a la mitad de manera longitudinal con un bisturí. Para el caso de las hojas se tomó una sección de 5 x 5 mm por hoja, con ayuda de un bisturí, de la parte media de la hoja que se ubicó entre la vena central y el borde. Tanto para el caso de los ovarios como de hojas se fijaron en FAA (50 % etanol al 96 % + 5 % ácido acético glacial + 10 % formaldehído al 37 % + 35 % de agua). Posteriormente se realizó un lavado en agua y etanol al 70 % y a continuación se conservaron en GAA (25 % glicerol + 50 % 2-propanol + 0.002 % eosina + 25 % agua) hasta el momento de incluirlos en parafina para realizar los cortes anatómicos que tuvieron un grosor de 10 µm, para lo cual se utilizó un micrótopo rotatorio. La observación se realizó en un microscopio (Carl Zeiss® Axiostar, DEU) con aumentos de 10X y 40X para ovario más anteras y de 40X para hoja. El grosor de la hoja se midió usando micrómetros objeto y de ocular. Se evaluó la anatomía de los óvulos en el ovario en base a la presencia o ausencia de óvulos, pared del ovario, núcleo del óvulo y tegumentos. Por otra parte, en la anatomía de polen en anteras, se determinó la viabilidad del polen en base al grado de coloración por parte de la tinción sobre el citoplasma de éste, en donde una tinción completa y de color rojo intenso es indicativo de un polen viable, por otra parte, un citoplasma no coloreado, o de una tonalidad baja es indicativo de un polen no viable.

Para la viabilidad de polen se usó la técnica modificada de Mercado *et al.* (1994), se preparó un medio sólido con 6 g L⁻¹ de agar-agar, 10% de sacarosa, 0.1 mM de ácido bórico y 1 mM de cloruro de calcio para dos cajas Petri. Se recolectaron cinco flores frescas en estado inicial de apertura a anthesis a los 135 ddt, excepto el tratamiento A100 %:R0 % que ya no contaba con flores, el polen fresco de las anteras se depositó sobre la superficie del medio de agar. Las cajas Petri se colocaron dentro de sus respectivos tratamientos de luz por dos horas, se observaron en un microscopio (Carl Zeiss® Axiostar,

DEU) con un aumento de 40X y se calculó el porcentaje de germinación de polen en cuatro campos por caja Petri.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar, una repetición estuvo constituida por una plántula. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), a la prueba de comparación de medias de Tukey (P < 0.05) utilizando el programa SAS V9.0 (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables de crecimiento de la planta

Los resultados de las variables de crecimiento se muestran en la Tabla 2. Se observó que las plantas que recibieron tratamientos con luz LED la altura de planta no fue significativamente diferente entre estos, sin embargo, el tratamiento con 100% de luz azul fue mayor al testigo. Las plantas del tratamiento A100, en donde no se recibió ninguna cantidad de luz roja, presentaron la menor frecuencia estomática respecto a las plantas que si recibieron cierto porcentaje de luz roja. Bajo la presencia de luz LED roja en los tratamientos evaluados, se obtuvieron frutos, excepto en las plantas que recibieron 34.5 % de luz azul, mientras que en las plantas del tratamiento monocromático rojo se obtuvo la mayor cantidad de frutos. Las variables que resultaron estadísticamente no significativas pudieron deberse a las podas de hojas a las cuales fueron sometidas las plantas durante el ciclo de crecimiento.

Verma *et al.* (2018) encontraron la mayor altura de planta en cultivo de digitales con un proporción de luz LED azul y roja A100 %:R0 % respecto a un tratamiento testigo fluorescente. Por otra parte, Naznin *et al.* (2019) no encontraron diferencias estadísticas en altura de planta de espinaca y albahaca entre cuatro diferentes tratamientos de luz roja y azul (A17 %:R83 %, A9 %:R91 %, A5 %:R95 %, A0 %:R100 %). Las plantas del testigo, a pesar de que recibieron la mitad de la intensidad luminosa en comparación con los tratamientos LED (Tabla 1), no tuvieron diferencia en altura de planta con los tratamientos LED que tuvieron presencia de luz roja, sin embargo, con las plantas que recibieron 100 % de luz azul si fue menor.

La luz roja a través de la acción de los fitocromos, tiende a elongar la altura de las plantas, mientras que la luz azul se le ha asociado con la formación más compacta y de menor altura en plantas (Berkovich *et al.*, 2017; Pocock, 2015). Sin embargo, en habanero, al no existir diferencias significativas entre tratamientos LED, la luz roja o azul no tuvieron un efecto evidente sobre la altura de planta, salvo en el caso de las plantas del testigo en comparación con las que recibieron 100 % de luz azul, la diferencia de altura pudo deberse principalmente a la menor intensidad luminosa que presentó.

Wollanger y Runkle (2015) encontraron un comportamiento similar en el área foliar en plántula de tomate. El índice de área foliar debe encontrarse entre 3.0 a 4.0 para que se aproveche de un 90 a 100 % de luz incidente, si es mayor el valor como en los resultados obtenidos, supone una pérdida

Tabla 2. Variables de crecimiento evaluadas en chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.**Table 2.** Growth variables evaluated in habanero pepper grown under controlled conditions with different ratios of blue and red LED light.

Var	Tratamientos*					
	FL	A0	A34.5	A57.1	A76.0	A100
AP	85.50±10.28b	102.90±35.52b	94.63±11.66b	97.37±17.41b	109.70±17.97b	176.77±4.57a
GT	8.03±0.28 ^{ns}	10.91±1.71 ^{ns}	11.30±1.40 ^{ns}	11.95±0.73 ^{ns}	9.05±0.85 ^{ns}	9.80±0.33 ^{ns}
AF	2008.0±714.2 ^{ns}	1991.0±1592.3 ^{ns}	2703.0±1037.3 ^{ns}	2661.0±828.0 ^{ns}	2222.0±1220.5 ⁿ	1989.0±565.1 ^{ns}
IAF	4.56±1.62 ^{ns}	4.56±3.62 ^{ns}	6.16±2.36 ^{ns}	6.06±1.88 ^{ns}	5.03±2.77 ^{ns}	4.53±1.28 ^{ns}
PFT	47.00±12.45 ^{ns}	74.73±48.50 ^{ns}	81.27±26.48 ^{ns}	61.03±9.80 ^{ns}	80.00±48.66 ^{ns}	182.63±45.76 ^{ns}
PFH	34.27±4.64 ^{ns}	36.50±11.11 ^{ns}	49.90±7.47 ^{ns}	56.23±7.41 ^{ns}	44.83±10.10 ^{ns}	44.97±6.74 ^{ns}
PFPA	81.27±23.82 ^{ns}	111.23±76.79 ^{ns}	131.17±45.77 ^{ns}	117.27±14.82 ^{ns}	124.83±74.08 ^{ns}	227.60±62.48 ^{ns}
PST	6.49±2.36 ^{ns}	13.68±9.50 ^{ns}	12.52±5.96 ^{ns}	12.87±3.95 ^{ns}	12.41±8.82 ^{ns}	22.43±6.67 ^{ns}
PSH	3.31±1.55 ^{ns}	4.17±3.66 ^{ns}	5.04±2.58 ^{ns}	5.78±2.30 ^{ns}	5.62±3.76 ^{ns}	5.65±2.51 ^{ns}
PSPA	9.80±1.51 ^{ns}	17.85±5.10 ^{ns}	17.55±3.31 ^{ns}	18.65±2.38 ^{ns}	18.03±4.86 ^{ns}	28.07±3.52 ^{ns}
FE	127.00±5.12b	144.70±7.32ab	128.30±6.30ab	154.00±11.57ab	159.30±7.14a	88.30±6.76c
NF	0	24	0	5	4	0

*Medias con igual letra en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). ns= No significativo; Var= Variables; FL= fluorescente (testigo); AP= Altura de planta (cm); GT= Grosor de tallo (mm); AF= Área foliar (cm^2 planta⁻¹); IAF= Índice de área foliar; PFT= Peso fresco de tallo (g planta⁻¹); PFH= Peso fresco de hoja (g planta⁻¹); PFPA= Peso fresco de la parte aérea (g planta⁻¹); PST= Peso seco de tallo (g planta⁻¹); PSH= Peso seco de hoja (g planta⁻¹); PSPA= Peso seco de la parte aérea (g planta⁻¹); FE= Frecuencia estomática (mm^2); NF= Número de frutos por tratamiento.

de fotosintatos asimilados debido a la existencia de una mayor respiración por causa del sombreado en hojas inferiores de la planta Yamori (2016).

Hogewoning *et al.* (2010) encontraron en pepino resultados similares en la frecuencia estomática, con tratamientos de 0 %, 15 %, 30 %, 50 % de luz LED azul respecto a la luz LED roja donde no tuvieron diferencias estadísticas entre éstos. De manera contraria Wang *et al.* (2016) encontraron que el tratamiento monocromático rojo obtuvo la menor frecuencia estomática en lechuga en comparación con diferentes proporciones de luz LED azul y roja. El desarrollo de los estomas se ha asociado a los fitocromos, los cuales son activados por luz roja (Demotes-Mainard *et al.*, 2016; Pocock, 2015), con lo cual, se confirma que en plantas de habanero que recibieron diferentes proporciones de luz LED roja junto con el testigo, que posee un espectro completo de luz (416-715 nm), existió una mayor frecuencia estomática que las plantas que recibieron 100 % de luz azul.

Gangadhar *et al.* (2012) encontraron en chile picante cv. Cheonyang el mayor número de frutos por planta con una proporción de luz azul y roja de A50 %:R50 % (3.8), seguido del testigo fluorescente (3.3) y el tratamiento A0 %:R100 % (3.0), el menor número se obtuvo con el tratamiento A100 %:R0 % (2.1). En el caso de Naznin *et al.* (2019) registraron en pimiento dulce enano cv. Redstart, el mayor número de frutos por planta con una proporción de luz azul y roja de A5 %:R95 % (5), A9 %:R91 % (5) y los menores con los tratamientos A17 %:R83 % (1) y A0 %:R100 % (1).

El rendimiento de frutos del testigo pudo haber sido afectado debido a que tuvo la mitad de la luz integral diaria (LID) ($6.4 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de fotones) en comparación con los tratamientos con luz LED (13.0 a $13.2 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de fotones) (Tabla1). Además, fue 82 % menos de lo necesario para el testigo y 63 % para los tratamientos LED respecto a la LID que requiere una planta de tomate en etapa de producción ($35 \text{ mol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ de fotones) (Kubota, 2016). Lo anterior pudo generar una baja tasa en la fotosíntesis y una baja concentración de fotosintatos en la planta para llevar a cabo un adecuado amarre de frutos. A pesar de la falta de LID, en las plantas que recibieron solo luz roja existió una mayor cantidad de frutos. Esto pudo deberse a un posible efecto de la luz roja sobre los fitocromos en el amarre de frutos, ya que están relacionados en la regulación de la floración (Berkovich *et al.*, 2017; Demotes-Mainard *et al.*, 2016).

Concentración de pigmentos fotosintéticos y compuestos fenólicos en hoja

Los resultados obtenidos en la concentración de pigmentos fotosintéticos en hoja se muestran en la Tabla 3. De manera general se observó que las plantas que recibieron 0 % de luz azul tuvieron mayor concentración de clorofila a, b y total que el resto de tratamientos con luz LED, pero sin diferencias estadísticas en comparación al testigo y una disminución de concentración de carotenoides conforme la proporción de luz azul aumentó a partir de las plantas que recibieron 76 % y 100 % de luz azul en comparación con las plantas que solo recibieron luz roja.

Tabla 3. Pigmentos fotosintéticos y compuestos fenólicos en hojas de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.**Table 3.** Photosynthetic pigments and phenolic compounds in habanero pepper leaves grown under controlled conditions with different blue and red LED light proportions.

Variables	Tratamientos ^x					
	FL	A0	A34.5	A57.1	A76.0	A100
Cla	0.90±0.08ab	1.03±0.03a	0.68±0.04b	0.74±0.06ab	0.65±0.12b	0.65±0.06b
Clb	0.50±0.02ab	0.58±0.02a	0.40±0.02bc	0.39±0.02bc	0.35±0.05c	0.33±0.03c
Cltot	1.40±0.10ab	1.61±0.04a	1.09±0.06b	1.14±0.08b	1.00±0.17b	0.98±0.08b
Cla/b	1.81±0.09 ^{ns}	1.77±0.03 ^{ns}	1.68±0.02 ^{ns}	1.87±0.04 ^{ns}	1.81±0.08 ^{ns}	1.93±0.03 ^{ns}
Car	4.20±0.40ab	4.53±0.04a	3.16±0.18ab	3.43±0.22ab	2.93±0.47b	2.93±0.24b
CF	29.14±1.97b	39.27±1.14ab	29.86±3.58b	31.23±2.52b	40.93±3.04ab	53.36±4.75a

^xMedias con igual letra en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). ns= No significativo; FL= fluorescente (testigo); Cla= Clorofila a (mg g^{-1} de peso fresco); Clb= Clorofila b (mg g^{-1} de peso fresco); Cltot= Clorofila total (mg g^{-1} de peso fresco); Cla/b= Clorofila a/b; Car= Carotenoides (mg g^{-1} de peso fresco); CF= Fenoles totales (mg equivalentes de ácido gálico 100 g de peso fresco).

Liu *et al.* (2018) encontraron en plántulas de tomate un comportamiento similar de clorofila a, b y total, en plantas que recibieron 100% de luz azul, éstas obtuvieron la menor concentración en comparación con las que tuvieron 75 %, 60 %, 50 % y 25 % de luz respecto a luz roja. De manera contraria, Wang *et al.* (2016) observaron en lechuga un comportamiento contrario, en donde plantas que recibieron solo luz roja monocromática obtuvieron la menor concentración de clorofila total, en comparación con las que recibieron 100 %, 50 %, 20 %, 11 % de luz azul respecto a la luz roja. Agarwal *et al.* (2018) encontraron en espinaca un comportamiento similar a nuestros resultados respecto a la concentración de carotenoides.

El comportamiento de los pigmentos fotosintéticos en hoja, podrían explicarse en base a que la presencia de luz azul tiende a disminuir la clorofila total (Huché-Théliér *et al.*, 2016), y además los fitocromos, asociados a la luz roja, regulan las etapas tempranas de biosíntesis de clorofila y carotenoides (Berkovich *et al.*, 2017). Las plantas presentan un alto grado de plasticidad a las condiciones de luz que son expuestas, ya que al crecer bajo luz LED azul y roja, nunca recibieron longitudes de onda superiores a 680 nm, con lo cual el fotosistema II (680 nm) estará, preferentemente excitado en relación al fotosistema I (700 nm) durante todo el ciclo de crecimiento, esto no sucede en la naturaleza, pero aun así las plantas crecen y poseen mecanismos de aclimatación a largo plazo que aún no se han determinado (Pocock, 2015).

La concentración de compuestos fenólicos en hojas favoreció su acumulación en plantas que tuvieron un tratamiento monocromático azul en comparación con las que recibieron 34.5% y 57.1 % de luz azul y con el testigo (Tabla 3). Jeon *et al.* (2017) encontraron en *Oenanthe stolonifera* un comportamiento similar en la concentración de compuestos fenólicos en donde utilizaron tratamientos de luz monocromática azul y roja, al igual que diferentes proporciones de éstos.

La luz azul tiende a incrementar la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos (Berkovich *et al.*, 2017), debido

a que es un mecanismo de tolerancia al estrés foto-oxidativo y puede asumirse que está regulado por la producción de éste a través del fotorreceptor criptocromo, el cual está asociado con la foto activación a la luz azul (400 a 500 nm) y UV-A (320 a 400 nm) (Huché-Théliér *et al.*, 2016).

La presencia de luz azul y roja pueden ser responsables del aumento de la producción de metabolitos secundarios de la planta, debido a un aumento en la actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) la cual está involucrada en el primer paso de la vía de síntesis de fenilpropanoides (Hasan *et al.*, 2017). La enzima PAL se asocia con la producción de compuestos fenólicos en plantas, la cual es mayormente estimulada bajo la combinación de luz azul y roja (Heo *et al.*, 2012). Sin embargo, el comportamiento de los resultados puede variar debido a que no solo depende del tipo del espectro de luz que inciden en las plantas, si no, también depende de la especie, la variedad y etapa de desarrollo (Samuolienė *et al.*, 2012).

Concentración nutrimental en hoja

En la Tabla 4, se muestran los resultados que se obtuvieron de nutrientes en hoja chile habanero. En los macronutrientes, los diferentes tratamientos de luz no ejercieron efecto en la concentración de P en hoja, sin embargo, el tratamiento de luz monocromática roja presentó la menor concentración. Entre tratamientos con luz LED no existió diferencias estadísticas en la concentración de K, sin embargo, la concentración de K en las plantas del testigo fue mayor en comparación con las plantas que recibieron 0 % y 76 % de luz azul. La concentración de Mg en hoja fue mayor en las plantas que recibieron 0 % de luz roja en comparación con el resto de tratamientos LED y el testigo.

En los micronutrientes, la concentración de Cu en hojas de plantas del testigo y que recibieron 100 % de azul, fue mayor que las que recibieron solo luz monocromática roja. La concentración de Mn, fue mayor las hojas de las plantas que recibieron 0 % de luz azul que las que recibieron 100 % y 57.1 % de luz azul como además que las del testigo.

Tabla 4. Concentración nutrimental en hojas de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.**Table 4.** Nutrient concentration in habanero pepper leaves grown under controlled conditions with different blue and red LED light ratios.

Ele	Tratamientos*					
	FL	A0	A34.5	A57.1	A76.0	A100
N	4.69±0.07 ^{ns}	4.08±0.10 ^{ns}	4.81±0.42 ^{ns}	4.83±0.25 ^{ns}	5.30±0.30 ^{ns}	4.33±0.59 ^{ns}
P	0.47±0.00a	0.33±0.00b	0.52±0.03a	0.49±0.03a	0.45±0.00a	0.53±0.02a
K	5.20±0.06a	3.62±0.10b	3.92±0.41ab	4.14±0.42ab	3.75±0.19b	4.00±0.28ab
Ca	1.12±0.05 ^{ns}	1.41±0.07 ^{ns}	1.34±0.10 ^{ns}	1.32±0.05 ^{ns}	1.25±0.08 ^{ns}	1.40±0.10 ^{ns}
Mg	0.74±0.01b	1.30±0.07a	0.92±0.12b	0.68±0.02b	0.89±0.06b	0.68±0.03b
B	49.56±0.62 ^{ns}	52.37±1.95 ^{ns}	51.47±0.96 ^{ns}	46.47±1.46 ^{ns}	50.54±3.72 ^{ns}	59.40±5.54 ^{ns}
Fe	223.33±26.42 ^{ns}	166.25±13.94 ^{ns}	255.30±57.70 ^{ns}	198.93±8.19 ^{ns}	193.44±3.03 ^{ns}	244.12±22.94 ^{ns}
Cu	11.23±0.62a	5.24±0.18c	9.85±0.93ab	10.00±0.61ab	7.91±0.37bc	10.78±0.59a
Mn	96.850±14.41bc	171.20±8.61a	136.51±8.40ab	89.02±7.00bc	118.11±18.96abc	77.98±1.04c
Zn	136.69±7.51 ^{ns}	119.93±16.43 ^{ns}	188.35±34.12 ^{ns}	147.58±18.61 ^{ns}	119.88±12.48 ^{ns}	148.14±1.58 ^{ns}

*Medias con letras iguales en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). Ele= Elementos; ns= No significativo; FL= fluorescente (testigo); N= Nitrógeno (% de peso seco); K= Potasio (% de peso seco); P= Fósforo (% de peso seco); Ca= Calcio (% de peso seco); Mg= Magnesio (% de peso seco); Fe= Hierro (mg kg⁻¹ de peso seco); Mn= Manganeso (mg kg⁻¹ de peso seco); Zn= Zinc (mg kg⁻¹ de peso seco); B= Boro (mg kg⁻¹ de peso seco); Cu= Cobre (mg kg⁻¹ de peso seco).

Pennisi *et al.* (2019) encontraron en albahaca una tendencia de mayor acumulación de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe) con una proporción de luz azul y roja A23 %:R70 %. De manera contraria, Verma *et al.* (2018) registraron en digitales que una proporción de luz azul y roja A80 %:R20 % obtuvo la máxima concentración de nutrientes (P, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, B, Cu).

La regulación de nutrientes en plantas está asociado a factores como la especie, luz, temperatura, CO₂ ambiental, estrés hídrico, fitohormonas y la presencia de otros nutrientes, debido a un posible mecanismo de optimización de crecimiento al estar en diferentes condiciones de crecimiento (Sakuraba y Yanagisawa, 2017).

Sakuraba *et al.* (2018) mencionan que la luz roja promueve la absorción y acumulación de fósforo en *Arabidopsis* debido a que el fitocromo B media el mecanismo regulatorio de absorción y uso de fósforo en la planta, a través de dos vías de señalización y regulación asociadas a la luz roja: vía-fitocromo B-HY5 y vía-fitocromo B-PIFs (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR family), los cuales en conjunto inducen la expresión del gen transportador de fósforo inorgánico ubicado en raíz PHT1;1 (INORGANIC PHOSPHATE TRANSPORTER) y el gen PHL1 (HOMEODOMAIN-LIKE SUPERFAMILY PROTEIN) el cual induce también la expresión del gen PHT1;1.

La menor concentración de fósforo en hoja se registró en plantas que recibieron solo luz roja (Tabla 4), una posibilidad de esto pudo deberse a la alta demanda de nutrientes y fotosintatos a la cual la planta estaba sometida, debido a que tuvo una mayor cantidad de frutos respecto al resto de tratamientos.

García-Caparrós *et al.* (2019) mencionan que la concentración de potasio en plántulas de *Arabidopsis* se incrementó con luz azul debido a cambios en la actividad de

transporte de la membrana en células guarda en estomas. Este comportamiento no se observó en ningún tratamiento con luz LED en plantas de habanero, sin embargo, se puede asumir que otras longitudes de onda pudieran estar involucradas en la absorción de potasio, dado que en las plantas que recibieron luz fluorescente, el cual tiene un espectro completo que abarca desde los 416 – 715 nm, se obtuvo mayor concentración en comparación que las plantas que recibieron 0 % y 76 % de luz azul.

El mecanismo que modula el contenido de cobre en cloroplastos se asocia con el factor de transcripción HY5, el cual es activado por la señalización generada de diversos fotoreceptores que son activados por el tipo de luz asociada a éstos, posteriormente el factor de transcripción HY5 interactúa físicamente con el factor de transcripción SPL7 (SQUAMOSA PROMOTER-BINDING PROTEIN-LIKE 7), los cuales coactivan el gen MIR408 (microRNA408) que es requerido para regular la expresión de los genes PETE1 (PLASOCYANIN 1) y PETE2 (PLASTOCYANIN 2), encargados de la síntesis de la proteína plastocianina que contiene cobre en su estructura y se ubica en cloroplastos (Gangappa y Botto, 2016; Sakuraba y Yanagisawa, 2017). Por alusión a lo anterior, en el tratamiento monocromático azul se promovió la síntesis de plastocianina asociada a cobre en plantas de habanero en comparación con las plantas que recibieron luz roja monocromática.

Miao *et al.* (2019) mencionan que la luz roja promueve la acumulación de manganeso, lo cual coincidió con lo obtenido en planta de habanero en el tratamiento monocromático rojo en comparación con los resultados del tratamiento monocromático azul.

La concentración de nutrientes en tejidos de plantas puede ser modificada por factores específicos como la transpiración, apertura estomática, tasa de crecimiento y acumu-

lación de biomasa en diferentes etapas de desarrollo (Pennisi *et al.*, 2019). Se ha demostrado que la luz azul está involucrada en el proceso de acumulación de nutrientes en planta a través de mecanismos que incrementan la activación de las bombas de protones y la actividad de canales iónicos en membranas celulares, con lo cual se incrementa la actividad de transporte de iones en las membranas celulares en los tejidos de plantas (Gerovac *et al.*, 2016). La luz azul tiene además la capacidad de regular la apertura estomática, lo cual, junto con la capacidad que tiene de incrementar el transporte de iones a través de las membranas celulares, puede afectar directamente la absorción de nutrientes mediante un aumento en la transpiración de la planta (Craver *et al.*, 2018). Existe poca información sobre como ciertas longitudes de onda pueden afectar la dinámica de absorción de nutrientes en plantas, por lo cual se requiere mayor investigación para descifrar estos mecanismos (Amoozgar *et al.*, 2016).

Variables anatómicas y viabilidad de polen

Los cortes anatómicos mostraron la existencia de óvulos bien desarrollados dentro de los ovarios, en base a la presencia de óvulos dentro del ovario, pared de ovario, núcleo del ovulo y tegumentos en todos los tratamientos evaluados. Por otra parte, hubo la presencia de polen maduro viable en anteras, en base a la existencia de una tinción completa del citoplasma del polen y de color rojo intenso en casi todos los granos de polen que se observaron en los cortes anatómicos a lo largo de todos los tratamientos evaluados (Figura 1). Estos resultados coinciden con la descripción descrita por Pérez-Pastrana *et al.* (2018) en cortes anatómicos de flores en antesis para la misma variedad de chile habanero.

El mayor porcentaje de germinación de granos de polen se presentó en las plantas del testigo, sin embargo, no existió diferencias entre los diferentes tratamientos con luz LED (Tabla 5). Dhawan y Malik (1981) estudiaron la germinación de polen *in vitro* en *Pinus roxburghii* con diferentes tipos de luz y encontraron el menor porcentaje con luz fluorescente (40 %) < luz roja + rojo lejano (40 %) < luz azul (60 %) < oscuridad (60 %) < luz roja (95 %) y luz roja con el máximo de germinación. Hoyo *et al.* (2014) investigaron la germinación de polen *in vitro* en *Cyrtanthus mackenii* con cinco picos de longitud de onda, 405 nm (violeta), 465 nm (azul), 630 nm (rojo naranja), 660 nm (rojo), 735 nm (rojo lejano) y oscuridad, concluyendo que la luz no inhibió o promovió la germinación de polen ni tampoco las longitudes de onda afectaron la tasa de germinación.

Lo anterior sugiere que el efecto del tipo de luz sobre la germinación de polen depende de la especie; además, en chile habanero, los resultados en los tratamientos LED no presentaron diferencias estadísticas entre éstos. Por otra parte, la luz fluorescente al ser una fuente de luz de espectro completo (416 – 715 nm), promovió el porcentaje de germinación, probablemente a que posee una mayor diversidad de longitudes de onda en comparación con el resto de los tratamientos, e incluso a pesar de que la intensidad de la luz fluorescente fue la mitad en relación a estos mismos tratamientos de luz LED.

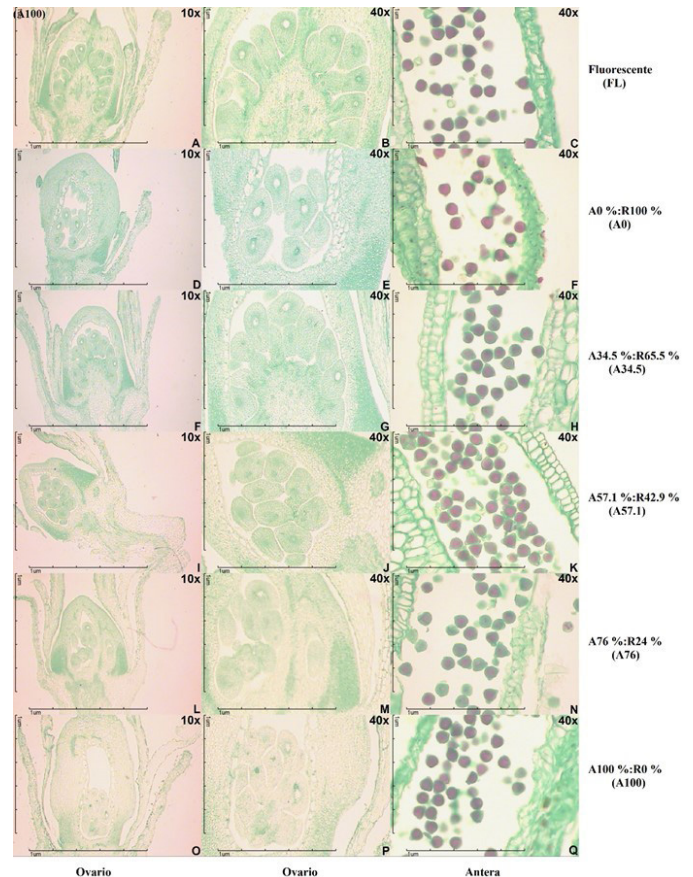


Figura 1. Cortes anatómicos longitudinales de ovario y polen de anteras de flores de chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.

Figure 1. Anatomical longitudinal sections of ovary and flower anther pollen of habanero pepper grown under controlled conditions with different blue and red LED light ratios.

Tabla 5. Germinación de polen y grosor de hoja en chile habanero cultivado bajo condiciones controladas con diferentes proporciones de luz LED azul y roja.

Table 5. Pollen germination and leaf thickness on habanero pepper grown under controlled conditions with different blue and red LED light ratios.

Variables	Tratamientos*					
	FL	A0	A34.5	A57.1	A76.0	A100
GP	44.83±5.65a	17.95±4.11b	4.30±1.76b	0.28±0.29b	12.17±6.57b	---
GH	115.21±5.1a	74.17±3.2d	93.89±3.66bc	76.67±2.43cd	94.72±2.90b	115.00±6.5a

*Medias con letras iguales en las filas son estadísticamente iguales (Tukey, P ≤ 0.05). ns= No significativo; FL= fluorescente (testigo); Var= Variables; GP= Germinación de polen (%); GH= Grosor de hoja (µm).

El grosor de hoja fue mayor tanto en las plantas del testigo como las que recibieron 100 % de luz azul en comparación con las que recibieron luz monocromática roja y las que tuvieron 76% de luz azul (Tabla 5). Wollanger y Runkle (2015) encontraron un comportamiento similar en salvia, ya que el grosor de hoja fue mayor en un tratamiento monocromático azul respecto a uno de rojo.

En Chile habanero, el diferente grosor de hoja entre tratamientos, pudo deberse a que la luz azul tiende a incrementar el grosor de hoja respecto a la luz roja (Huché-Thélier *et al.*, 2016). Evert y Eichhorn (2012) mencionan que, a mayor intensidad de luz, las hojas tienden a tener un mayor grosor y viceversa; sin embargo, en el testigo a pesar de tener la mitad de intensidad luminosa respecto a los tratamientos LED tuvo el mayor grosor de hoja junto con las plantas que recibieron luz azul monocromática.

CONCLUSIONES

Los tratamientos evaluados no indujeron un efecto en las variables de crecimiento. La presencia de luz LED roja indujo el amarre y desarrollo de los frutos, además, favoreció la frecuencia estomática.

La luz roja monocromática favoreció la acumulación de pigmentos fotosintéticos, mientras que la luz azul monocromática indujo mayor concentración de compuestos fenólicos en hoja en la mayoría de los tratamientos evaluados.

La luz roja monocromática indujo menor concentración P, y favoreció la concentración de Mg. La luz LED no generó efecto en la concentración de K, sin embargo, el testigo indujo mayor concentración en comparación con algunos tratamientos. La luz monocromática roja indujo menor concentración de Cu en hoja e indujo en Mn, mayor concentración en comparación con otros tratamientos evaluados.

El testigo incrementó la germinación de los granos de polen y el grosor de hoja, igual que la luz azul en esta última variable. La anatomía de los óvulos en ovarios y el polen en anteras no presentaron ningún efecto de los tratamientos.

REFERENCIAS

- Amoozgar, A., Mohammadi, A. y Sabzalian, M.R. 2016. Impact of light-emitting diode irradiation on the photosynthesis, phytochemical composition and mineral element content of lettuce cv. Grizzly. *Photosynthetica*. 55: 85-95. <https://doi.org/10.1007/s11099-016-0216-8>
- Alcántar, G. y Sandoval, M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Publicación especial 10. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Estado de México, México.
- Agarwal, A., Gupta, S.D., Barman, M. y Mitra, A. 2018. Photosynthetic apparatus plays a central role in photosensitive physiological acclimations affecting spinach (*Spinacia oleracea* L.) growth in response to blue and red photon flux ratios. *Environmental and Experimental Botany*. 156: 170-182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.09.009>
- AOAC. 1980. Official methods of analysis. 12th ed. Association of Official Analytical Chemistry. Washington, D.C.
- Berkovich, Y.A., Konovalova, I.O., Smolyanina, S.O., Erokhin, A.N., Avercheva, O.V., Bassarskaya, E.M., Kochetova, G.V., Zhigalova, T.V., Yakovleva, O.S. y Tarakanov, I.G. 2017. LED crop illumination inside space greenhouses. REACH - Reviews in Human Space Exploration. 6: 11–24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reach.2017.06.001>
- Blankenship, R.E. 2014. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2nd ed. Wiley Blackwell. New Delhi, India.
- Bojórquez-Quintal, E., Velarde-Buendía, A., Ku-González, A., Carillo-Pech, M., Ortega-Camacho, D., Echevarría-Machado, I., Pottosin I. y Martínez-Estévez, M. 2014. Mechanisms of salt tolerance in habanero pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.): proline accumulation, ions dynamics and sodium root-shoot partition and compartmentation. *Frontiers in Plant Science*. 5: 605. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00605>
- CICY. 2016. Ficha informativa unidad productora de semillas de Chile habanero. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Abril (2016): 1-15. [Consultado 10 enero 2020]. Disponible en: <https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/quienes-somos/2016/Ficha-UPS-Habanero.pdf>
- Craver, J.K., Boldt, J.K. y Lopez, R.G. 2018. Radiation intensity and quality from sole-source light-emitting diodes affect seedling quality and subsequent flowering of long-day bedding plant species. *HortScience*. 53(10): 1407-1415. <https://dx.doi.org/10.21273/HORTSCI13228-18>
- Dhawan, A.K. y Malik, C.P. 1981. Effect of growth regulators and light on pollen germination and pollen tube growth in *Pinus roxburghii* Sarg. *Annals of Botany*. 47(2): 239-248.
- Demotes-Mainard, S., Pérona, T., Corotb, A., Bertheloot, J., Gourrierecb, J.L., Pelleschi-Travierb, S., Crespel, L., Morel, P., Huché-Thélier, L., Boumaza, R., Vian, A., Guérin, V., Leduc, N. y Sakr, S. 2016. Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*. 121: 4–21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.05.010>
- Evert, R.F. y Eichhorn, S.E. 2012. *Raven biology of plants*. 8 ed. MacMillan, USA.
- Gangadhar, B.H., Mishra, R.K., Pandian, G. y Park, S.W. 2012. Comparative study of color, pungency, and biochemical composition in chili pepper (*Capsicum annuum*) under different light-emitting diode treatments. *Hortscience*. 47(12): 1729–1735. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.47.12.1729>
- Gangappa, S.N. y Botto, J.F. 2016. The multifaceted roles of hy5 in plant growth and development. *Molecular Plant*. 9: 1353–1365. <https://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2016.07.002>
- García-Caparrós, P., Almansa, E.M., Chica, R.M. y Lao, M.T. 2019. Effects of artificial light treatments on growth, mineral composition, physiology, and pigment concentration in *Dieffenbachia maculata* "Compacta" plants. *Sustainability*. 11: 2867. <https://dx.doi.org/10.3390/su11102867>
- Gerovac, J.R., Craver, J.K., Boldt, J.K. y Lopez, R.G. 2016. Light intensity and quality from sole-source light-emitting diodes impact growth, morphology, and nutrient content of Brassica microgreens. *HortScience*. 51(5): 497-503. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.51.5.497>
- Hasan, M., Bashir, T., Ghosh, R., Lee, S. K., y Bae, H. 2017. An overview of LEDs' effects on the production of bioactive compounds and crop quality. *Molecules*. 22(9): 1420. <https://dx.doi.org/10.3390/molecules22091420>
- Heo, J.W., Kang, D. H., Bang, H. S., Hong, S. G., Chun, C. H., y Kang, K. K. 2012. Early growth, pigmentation, protein content, and phenylalanine ammonia-lyase activity of red curled lettuces grown under different lighting conditions. *Korean Journal*

- of Horticultural Science and Technology. 30(1): 6-12. <https://dx.doi.org/10.7235/hort.2012.11118>
- Hoagland, D.R. y Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. California Agricultural Experiment Station. California, USA.
- Hogewoning, S.W., Trouwborst, G., Maljaars, H., Poorter, H., van Ieperen, W. y Harbinson, J. 2010. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *Journal of Experimental Botany*. 61(11): 3107-3117. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq132>
- Hoyo, Y., Fujiwara, K. y Hoshino, Y. 2014. Effects of different wavelengths of LED light on pollen germination and direction of pollen tube elongation in *Cyrtanthus mackenii*. *Advances in Horticultural Science*. 28(4): 190-194.
- Huché-Théliér, L., Crespel, L., Gourrierc, J.L., Morel, P., Sakr, S. y Leduc, N. 2016. Light signaling and plant responses to blue and UV radiations—Perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*. 121: 22-38. <https://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.06.009>
- Jeon, Y., Son, K., Kim, S. y Oh, M. 2017. Growth and bioactive compounds as affected by irradiation with various spectrum of light-emitting diode lights in dropwort. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 58: 467-478. <https://doi.org/10.1007/s13580-017-0354-3>
- Katagiri, F., Canelon-Suarez, D., Griffin, K., Petersen, J., Meyer, R.K. y Siegle, M. 2015. Design and construction of an inexpensive homemade plant growth chamber. *PLoS ONE*. 10(5): e0126826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126826>
- Kozai, T. y Niu, G. 2016. Role of the plant factory with artificial lighting (PFAL) in urban areas. En: *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production*. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 115-128. Academic Press, USA. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00002-0>
- Kubota, C. 2016. Growth, development, transpiration and translocation as affected by abiotic environmental factors. En: *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production*. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 151-164. Academic Press, USA. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.00010-X>
- Lim, T. K. 2013. *Capsicum chinense*. En: *Edible medicinal and non-medicinal plants: Volume 6, Fruits*. T. K. Lim (ed.), pp 205-212. Springer Science+Business Media, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5628-1_30
- Liu, X. Y., Jiao, X. L., Chang, T. T., Guo, S. R. y Xu, Z. G. 2018. Photosynthesis and leaf development of cherry tomato seedlings under different LED-based blue and red photon flux ratios. *Photosynthetica*. 56: 1212-1217. <https://dx.doi.org/10.1007/s11099-018-0814-8>
- Miao, Y., Chen, Q., Qu, M., Gao, L. y Hou, L. 2019. Blue light alleviates 'red light syndrome' by regulating chloroplast ultrastructure, photosynthetic traits and nutrient accumulation in cucumber. *Scientia Horticulturae*. 257: 108680. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108680>
- Mercado, J.A., Fernández-Muñoz, R.F. y Quesada, M.A. 1994. In vitro germination of pepper pollen in liquid medium. *Scientia Horticulturae*. 57: 273-281. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(94\)90110-4](https://doi.org/10.1016/0304-4238(94)90110-4)
- Naznin, M.T., Lefsrud, M., Gravel, V. y Azad, M.O.K. 2019. Blue light added with red LEDs enhance growth characteristics, pigments content, and antioxidant capacity in lettuce, spinach, kale, basil, and sweet pepper in a controlled environment. *Plants*. 8(4): 93. <https://doi.org/10.3390/plants8040093>
- Pennisi, G., Blasioli, S., Cellini, A., Maia, L., Crepaldi, A., Braschi, I., Spinelli, F., Nicola, S., Fernandez, J.A., Stanghellini, C., Marcellis, L.F.M., Orsini, F. y Gianquinto, G. 2019. Unraveling the role of red:blue LED lights on resource use efficiency and nutritional properties of indoor grown sweet basil. *Frontiers in Plant Science*. 10: 305. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00305>
- Pérez-Pastrana, J., Islas-Flores, I., Bárány, I., Álvarez-López, D., Canto-Flick, A., Canto-Canché, B., Peña-Yama, L., Muñoz-Ramírez, L., Avilés-Viñas, S., Testillano, P.S. y Santana-Buzzy, N. 2018. Development of the ovule and seed of Habanero chili pepper (*Capsicum chinense* Jacq.): Anatomical characterization and immunocytochemical patterns of pectin methyl-esterification. *Journal of Plant Physiology*. 230: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.005>
- Pocock, T. 2015. Light-emitting diodes and the modulation of specialty crops: light sensing and signaling networks in plants. *HortScience*. 50(9): 1281-1284. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.9.1281>
- Ruiz-Lau, N., Medina, F. y Martínez, M. 2011. El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*. Julio-Septiembre: 70-77.
- Sakuraba, Y., Kanno, S., Mabuchi, A., Monda, K., Iba, K. y Yanagisawa, S. 2018. A phytochrome-B-mediated regulatory mechanism of phosphorus acquisition. *Nature plants*. 4: 1089-1101. <https://dx.doi.org/10.1038/s41477-018-0294-7>
- Sakuraba, Y., y Yanagisawa, S. 2017. Light signalling-induced regulation of nutrient acquisition and utilisation in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 83: 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.12.014>
- Samuoliene, G., Sirtautas, R., Brazaitytė, A. y Duchovskis, P. 2012. LED lighting and seasonality effects antioxidant properties of baby leaf lettuce. *Food Chemistry*. 134(3): 1494-1499. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.061>
- SAS Institute (2002) SAS System for Windows Computer Program. Software Version 9.0. Cary, North Carolina, USA.
- Singleton, V.L. y Rossi, J.A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Society for Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- Trujillo, J.J.G. 2018. Caracterización de los recursos genéticos de *Capsicum chinense* Jacq. en la península de Yucatán. En: *Mejoramiento genético del chile habanero de la Península de Yucatán*. T.A. González (ed.), pp 37-43. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México.
- Verma, S.K., Gantait, S., Jeong, B.R. y Hwang, S.J. 2018. Enhanced growth and cardenolides production in *Digitalis purpurea* under the influence of different LED exposures in the plant factory. *Nature Scientific Reports*. 8: 18009. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36113-9>
- Wang, J., Lu, W., Tong, Y. y Yang, Q. 2016. Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Frontiers in Plant Science*. 7: 250. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00250>
- Wollanger, H.M. y Runkle, E.S. 2015. Growth and acclimation of impatiens, salvia, petunia, and tomato seedlings to blue and red light. *HortScience*. 50(4): 522-529. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.4.522>
- Yamori, W. 2016. Photosynthesis and respiration. En: *Plant factory: An indoor vertical farming system for efficient quality food production*. T. Kozai, G. Niu y M. Takagaki (ed.), pp 141-149. Academic Press, USA. [https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.0009-3\(LAI\)](https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801775-3.0009-3(LAI))

Caracterización tecno-funcional de un concentrado proteínico obtenido de la semilla de mango (*Mangifera indica* L.)

Techno-functional characterization of a proteinic concentrate obtained from mango (*Mangifera indica* L.) seed

Ma. del Rosario Pérez Saucedo¹, José Amando Ulloa^{1,2*}, Petra Rosas Ulloa², José Carmen Ramírez Ramírez³, Yessica Silva-Carrillo⁴, Blanca Estela Ulloa Rangel⁵

¹ Posgrado en Ciencias Biológico Agropecuarias, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km. 9, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

² Centro de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura Amado Nervo, C.P. 63190, Tepic, Nayarit, México.

³ Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Compostela-Chapalilla Km 3.5, C.P. 63700, Compostela, Nayarit, México.

⁴ Unidad Académica de Agricultura, Universidad Autónoma de Nayarit. Carretera Tepic-Compostela Km. 9, C.P. 63780, Xalisco, Nayarit, México.

⁵ Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas y Farmacéuticas, Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la Cultura Amado Nervo, C.P. 63155, Tepic, Nayarit, México.

RESUMEN

Se evaluaron las propiedades tecno-funcionales de un concentrado proteínico de semilla de mango (CPSM) obtenido por extracción alcalina seguido de precipitación isoeléctrica. Los contenidos de proteína, grasa, cenizas y carbohidratos totales del concentrado proteínico fueron 70.0 %, 4.0 %, 3.8 % y 22.1 %, respectivamente, y las capacidades de absorción de agua y aceite, capacidad de emulsificación y concentración mínima de gelificación fueron de 11.5 g/g proteína, 3.2 g/g proteína, 169.7 mL/g proteína y 3%. El valor de pH afectó la actividad y estabilidad de la emulsión, capacidad y estabilidad de la espuma, así como la formación del gel del concentrado proteínico. Los mejores valores de pH para la extracción y precipitación isoeléctrica de las proteínas para la obtención del CPSM fueron 11 y 5, respectivamente. Considerando los resultados de la evaluación de las propiedades tecno-funcionales, el CPSM podría usarse como ingrediente en productos de panificación, carnes procesadas, mayonesa, aderezos para ensalada, jaleas y postres.

Palabras clave: concentrado proteínico, semilla de mango, propiedades fisicoquímicas, propiedades funcionales.

ABSTRACT

A proteinic concentrate obtained from defatted mango (CPSM) seed meal, by alkaline extraction followed by isoelectric precipitation, was evaluated for its techno-functional properties. The protein, fat, ash, and total carbohydrate contents of the proteinic concentrate were 70.0 %, 4.0 %, 3.8 %, and 22.1 %, respectively. The water and oil absorption capacities, emulsification capacity, and least gelation concentration for the proteinic concentrate were 11.5 g/g protein, 3.2 g/g protein, 169.7 mL/g protein, and 3.0%, respectively. The emulsion activity, emulsion stability, foam capacity, foam stability and gel formation of the protein concentrate were

affected by pH. The best pH values for the extraction and isoelectric precipitation of proteins, to obtain the mango proteinic concentrate from mango seed, were 5 and 11, respectively. According to the results of the techno-functional properties evaluation, CPSM could be used as an ingredient in bakery products, processed meat, mayonnaise, dressings, jelly, and desserts.

Keywords: protein concentrate, mango seed, physicochemical properties, functional properties.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un interés cada vez mayor por explorar nuevas fuentes de proteínas derivadas de plantas, con base en fundamentos económicos, ambientales y de salud, especialmente para uso funcional (Houde *et al.*, 2018). Cuando la proteína no se considera como el componente alimenticio principal, sino como uno de muchos componentes, su funcionalidad puede ser el criterio de evaluación más importante, aún más que su valor nutricional. Las características tecno-funcionales expresan las propiedades fisicoquímicas de las proteínas alimentarias que determinan su comportamiento en los alimentos durante el procesamiento, almacenamiento y consumo; dichas propiedades y la forma en que las proteínas interactúan con otros componentes influye directa e indirectamente en las aplicaciones de procesamiento, la calidad y la aceptación de los alimentos (Mohan y Mellen, 2020).

Derivado del aprovechamiento industrial de las principales frutas tropicales, se genera una gran cantidad de residuos, representados por la corteza, cáscara y semillas, cuya proporción puede llegar a ser desde un 20% como en el caso de la papaya, hasta un 70% como lo es en el caso la jaca (Cheok *et al.*, 2018); dependiendo de la variedad de mango, la proporción de residuos con respecto a la fruta entera varía

del 35 % al 60 % (Anil Kumar y Sucharitha, 2018). Los subproductos o residuos del procesamiento de frutas contienen proteínas, azúcares, fibra, lípidos, así como vitaminas y otros agentes bioactivos, que cuando se destinan para elaborar composta o alimentación animal, muchas moléculas funcionales de alto valor agregado se pierden o son subutilizadas (Rico *et al.*, 2020).

Por otra parte, la producción mundial de mango en el año de 2018, fue de 45.5 millones de ton, ubicándose México como sexto productor, seguido de la India, China, Tailandia, Indonesia y Pakistán (FAO, 2020), con 2.08 millones de ton (SIAP, 2020) para el año 2019. De los subproductos o residuos de mango se han realizado diversos trabajos para usarlos como fuente de fibra y antioxidantes (Blancas-Benitez *et al.*, 2015), carotenoides (de Ancos *et al.*, 2018), grasas comestibles (Lieba *et al.*, 2019), almidón (Kaur *et al.*, 2019) y pectinas (Arora *et al.*, 2018), principalmente.

Sin embargo, hasta la fecha la semilla de mango no ha sido valorizada como materia prima para la obtención de concentrados o aislados proteínicos, por lo que también se desconoce la potencialidad de tales productos en la elaboración de alimentos, dependiendo de sus propiedades tecno-funcionales. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue la obtención y caracterización tecno-funcional de un concentrado proteínico a partir de semillas de mango, para evaluar su potencial como ingrediente de alimentos para consumo humano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de la materia prima

Un lote de 100 kg de semilla de mango de la variedad Keitt se obtuvo de la empresa Mexifrut, S.A. de C.V., la cual se localiza en la ciudad de Tepic, Nayarit. Las semillas de mango se lavaron con agua y a partir de las mismas se obtuvieron sus almendras. De las almendras se prepararon rebanadas de 3 mm de espesor con ayuda de un procesador de alimentos doméstico (Moulinex, Grupo Seb Mexico, S.A. de C.V., Ciudad de México), para luego deshidratarlas a 40 °C por 24 h, en una estufa de convección forzada (Precision Scientific Group, Chicago, EUA). Enseguida, el producto deshidratado se pulverizó en un molino helicoidal manual, para proceder a su desengrasado en una unidad de extracción sólido-líquido tamaño piloto (QVF Process Systems, Inc., New York, EUA) con éter etílico por 16 h. Finalmente, a la harina desengrasada de la almendra de semilla de mango (HSDM) se le eliminó el solvente en charolas de acero inoxidable por 2 h en una campana de extracción de humos a temperatura ambiente (25 °C).

Preparación del concentrado proteínico

La preparación del concentrado proteínico se realizó mediante la extracción alcalina y precipitación isoelectrica de las proteínas de la HSDM, de acuerdo con el método reportado por Bernardino-Nicanor *et al.* (2014). Las condiciones de extracción y precipitación isoelectrica se determinaron me-

dante la definición de una curva de solubilidad en el rango de pH de 2 a 11. La HSDM se mezcló con agua destilada en una relación 1:20 y se ajustó al pH de máxima extracción de proteína con NaOH 1.0 M en lotes de 5 L, con ayuda de agitación magnética por 20 min a 25 °C, recuperando el sobrenadante por centrifugación a 2,490 x g. Enseguida, el pH del sobrenadante se ajustó al de extracción mínima de proteína (punto isoelectrico), con HCl 1 N y la mezcla se agitó por 20 min a 25 °C, para separar el precipitado a 2,490 x g por 20 min a 25 °C. A continuación, el precipitado proteínico se sometió a 5 extracciones con etanol al 96 %, en una relación 1:20 (precipitado proteínico:etanol), con agitación por 20 min, el cual finalmente se recuperó por centrifugación a 2,490 x g por 20 min a 25 °C y se liofilizó para obtener el concentrado proteínico de semilla de mango (CPSM).

Análisis proximal

Los contenidos de humedad, proteína (N x 6.25), grasa y cenizas se determinaron por triplicado de acuerdo a los métodos oficiales de la AOAC (2000), y se expresaron en % en base seca, mientras que el contenido de carbohidratos totales se calculó por diferencia.

Propiedades tecno-funcionales

Las capacidades de absorción de agua (CAA_g), aceite (CAAc) y emulsificante (CE), así como la actividad emulsificante (AE) y la estabilidad de la emulsión (EE), a valores de pH de 2, 4, 6, 8 y 10, se obtuvieron a través de las técnicas reportadas por Ulloa *et al.* (2011). El perfil de solubilidad de las proteínas por efecto del pH (2-11), la capacidad espumante (CEs) y estabilidad de la espuma (EEs), a valores de pH de 2, 4, 6, 8 y 10, así como la concentración mínima gelificante (CMG), mediante los métodos de Piornos *et al.* (2015), Flores-Jiménez *et al.* (2019) y Benelhadj *et al.* (2016), respectivamente.

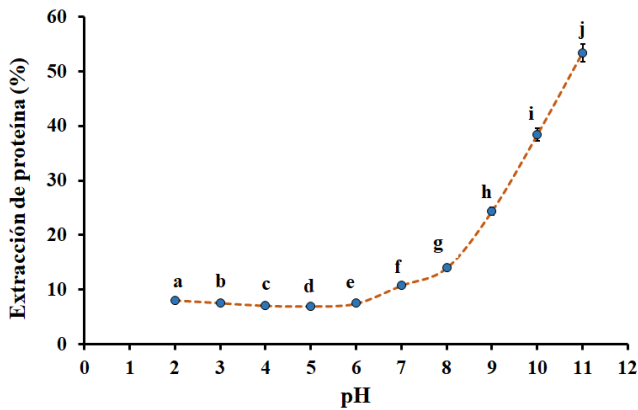
Análisis estadístico

Los resultados del análisis proximal y de las propiedades tecno-funcionales se expresaron como el promedio de tres determinaciones con su desviación estándar. En el caso de las propiedades tecno-funcionales en los que se evaluó el efecto del pH, para determinar diferencias significativas entre los resultados ($p \leq 0.05$) se utilizó un análisis de varianza de una sola vía y la prueba de Tukey, con el paquete estadístico Statgraphics Centurion Version 15.2 (Manugistics, Inc., Rockville, EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestra el efecto del pH en la extracción de proteína de la HSDM. La máxima extracción de proteína fue del 53.4 % al pH de 11, mientras que la mínima fue del 6.9 % al pH de 5 (punto isoelectrico). Por lo tanto, encontrados esos valores de pH, se seleccionaron para la extracción y precipitación isoelectrica en la preparación de concentrado proteico.

Los resultados del análisis proximal de la HSDM y el CPSM se muestran en la Tabla 1. El contenido de proteína



Valores con diferentes letras (a-j) son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Values with different letters (a-j) are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$)

Figura 1. Efecto del pH en la extracción de proteínas de la harina desengrasada de semilla de mango.

Figure 1. Effect of pH on the protein extraction from mango seed defatted meal.

Tabla 1. Composición química de la harina de semilla de mango desengrasada (HSDM) y del concentrado proteínico de semilla desengrasada de mango (CPSM).

Table 1 Chemical composition of the defatted mango seed meal (HSDM) and mango seed proteinic concentrate (CPSM).

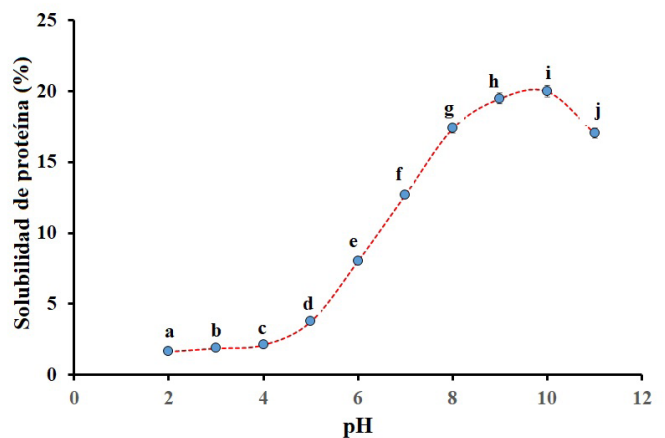
Componente	HSDM (%)	CPSM (%)
Grasa	2.7 ± 0.3	4.0 ± 0.2
Cenizas	2.4 ± 0.0	3.8 ± 0.0
Proteína (N x 6.25)	8.2 ± 0.2	70.0 ± 0.1
Carbohidratos totales	86.7 ± 0.1	22.2 ± 0.1

Los valores son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar en base seca. Values are given as mean ± standard deviation of triplicate measurements on dry basis.

de 8.2 % de la HSDM de este estudio fue más alto que los reportados para las harinas de semillas de las variedades de mango Nigeria, Kibangou y Zebda con 6.1 %, 6.36 % y 7.76 %, respectivamente (Torres-León *et al.*, 2016). Por otra parte, el contenido de proteína del CPSM fue del 70.0 %, lo que representó un incremento de 8.5 veces la proteína inicial de la HSDM. Los contenidos de proteína para los concentrados obtenidos a partir de semillas de granada (45.8 % de proteína) y uva (30.1 % de proteína) por extracción alcalina-precipitación isoeléctrica se ubicaron muy por debajo del obtenido para el CPSM de este estudio (Coşkun y Gülseren, 2020). Por otra parte, Haque *et al.* (2020) obtuvo un concentrado a partir de semillas de jaca con un contenido proteínico de 76.89 %, mientras que Mechmeche *et al.* (2017), optimizó los parámetros de extracción de proteína de la semilla desengrasada de tomate para obtener un producto con 80.37 % de proteína. Como puede observarse, el contenido de proteína de los concentrados proteínicos varía ampliamente, lo cual depende de las características de la materia prima y las condiciones de extracción de las proteínas (Stone *et al.*, 2015).

La solubilidad de las proteínas es un factor importante para su aplicación funcional en la industria de alimentos (Wang *et al.*, 2019). El perfil de solubilidad de las proteínas del CPSM en el intervalo de pH 2-11 se muestra en la Figura 2. De acuerdo a esos resultados, la solubilidad mínima fue a un pH de 2 (1.65 %) y progresivamente aumentó con el incremento del pH, hasta un valor máximo de pH 10 (20 %). Esa misma tendencia en el aumento de la solubilidad proteínica a partir del punto isoeléctrico, también se ha observado en otros aislados (Kaushik *et al.* 2016; Wani *et al.* 2015), a diferencia de aquellos que experimentan una curva de solubilidad proteínica en forma de U, la cual se caracteriza por tener una solubilidad mínima en el punto isoeléctrico, y por debajo o superior a ese valor de pH, se incrementa la solubilidad (Guo *et al.*, 2019; Flores-Jiménez *et al.*, 2019). Cuando los concentrados o aislados proteínicos se utilizan como ingredientes en la industria de alimentos, sus propiedades tecno-funcionales de CAAG, CAAC y CE son muy importantes ya que favorecen la calidad de los productos y la rentabilidad de los procesos (López *et al.*, 2019). En la Tabla 2 se muestran la CAAG, CAAC y CE del CPSM. La CAAG del CPSM fue de 11.54 g/g proteína, siendo superior en 399.3 % (2.89 g/g proteína) al de semilla de jaca (Haque *et al.*, 2020) y en 415.1 % (2.78 g/g proteína) al de la semilla de chile pimienta (Li *et al.*, 2018). Los concentrados proteínicos con valores altos de CAAG en productos de panificación, ayudan a reducir la pérdida de humedad y mantener la frescura, dada la alta capacidad de retención de agua de sus proteínas (Benelhadj *et al.*, 2016).

Por otra parte, la CAAC del CPSM fue de 3.20 g/g proteína, en comparación con 2.37 g/g proteína para un concentrado proteínico de semillas de sandía (83.3 % de proteína) de la variedad Mateera (Wani *et al.*, 2011) y con 1.4 g/g de proteína de un concentrado proteínico de semilla de tamarindo (68.3 % de proteína; Biswas y Sit, 2020); ambos



Valores con distintas letras (a-j) son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Values with distinct letters (a-j) are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figura 2. Perfil de solubilidad del concentrado proteínico de semilla de mango en el rango de pH 2-11.

Figure 2. Solubility profile from mango seed proteinic concentrate in the range of pH 2-11.

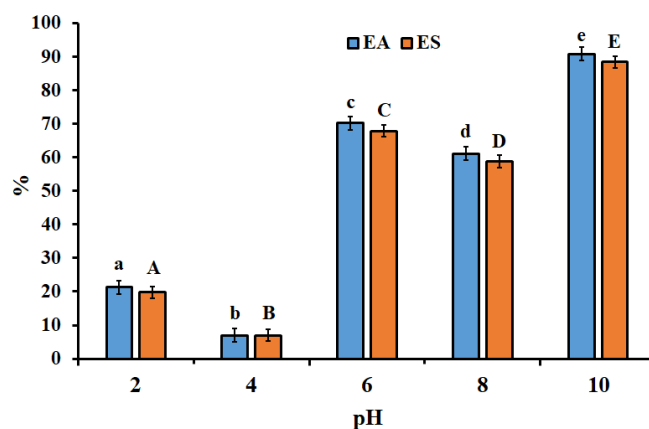
Tabla 2. Capacidades de absorción de agua, de aceite y de emulsificación del concentrado proteínico de semilla de mango.**Table 2.** Water, oil emulsifying capacities of mango seed proteinic concentrate.

Propiedad funcional	Valor
Capacidad de absorción de agua (g agua/g proteína)	11.5 ± 0.1
Capacidad de absorción de aceite (g aceite/g proteína)	3.2 ± 0.1
Capacidad emulsificante (mL aceite/g proteína)	169.7 ± 1.8

Los valores son el promedio de tres determinaciones ± desviación estándar en base seca. Values are given as mean ± standard deviation of triplicate measurements on dry basis.

obtenidos por extracción alcalina y precipitación isoelectrica. La CAAC de los concentrados proteínicos representa un aspecto crítico cuando se utilizan como ingredientes en la elaboración de productos horneados, sopas y extensores cárnicos, ya que en la medida de que su valor es más alto, se mejora sustancialmente la retención del sabor, así como la sensación de suavidad en la boca de los productos en los que se emplean (Ulloa *et al.*, 2011). Los valores de la CAAC de los concentrados o aislados proteínicos obtenidos a partir de fuentes vegetales como las leguminosas, que son los más utilizados, se encuentran en el intervalo de 1.1-3.9 g/g de proteína (Boye *et al.*, 2010).

La CE es la cantidad de aceite que puede emulsionarse por una cantidad de proteína, en relación al peso total de la emulsión, después de lo cual sufre una inversión, transformándose de una emulsión de aceite en agua a otra de agua en aceite (Lam y Nickerson, 2013). La CE del CPSM fue 169.7 mL/g proteína, en comparación con 32.2 mL/g proteína para un aislado proteínico (92.5 % de proteína) de semilla de jaca (Ulloa *et al.*, 2017) y con 14.6 mL/g proteína para un aislado proteínico (90.4 % de proteína) obtenido del fruto del árbol del pan (*Adansonia digitata* L.) por extracción alcohólica (Adenken *et al.*, 2017). En la selección de un concentrado o aislado proteínico como ingrediente en la formulación de alimentos de alto consumo tipo emulsión (salchichas, mayonesa y aderezos para ensaladas), es determinante que tengan un valor alto de CE (Haque *et al.*, 2020). Como se aprecia en la Figura 3, la AE y EE del CPSM mostraron que son propiedades dependientes del pH, el cual influye en el equilibrio hidrofóbico-hidrofílico de las proteínas. Los valores mínimo y máximo de la AE para el CPSM fueron a pH 4.0 (6.9 %) y pH 10.0 (90.8 %), respectivamente. La AE es dependiente de la solubilidad y pH del CPSM. Dicho comportamiento fue similar al reportado por Bernardino-Nicanor *et al.* (2014) para un aislado proteínico de semilla de zapote mamey (95 % de proteína) y por Haque *et al.* (2020) para un concentrado proteínico de semilla de jaca (76.89%), en los cuales los valores más altos de AE se encontraron en las condiciones extremas de acidez o alcalinidad. Sin embargo, según dichos estudios, los valores máximos de la AE para el aislado proteínico de semilla de zapote mamey (45 %) y el concentrado proteínico de semilla de jaca (63 %), resultaron 45.8 % y 27.8 % inferiores a la AE del CPSM, respectivamente. La EE del CPSM mostró un



Valores con distintas letras (a-e; A-E) son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

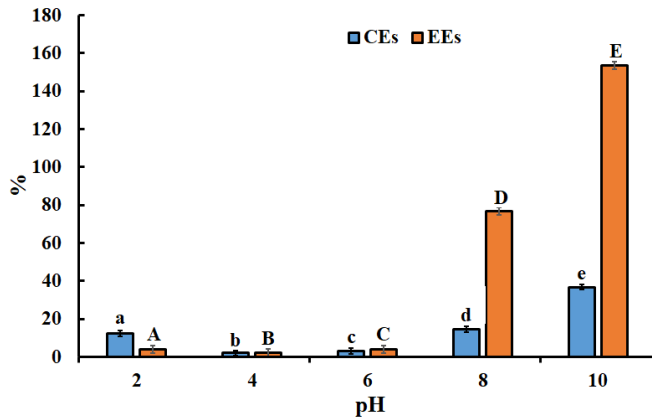
Values with distinct letters (a-e; A-E) are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figura 3. Efecto del pH en la actividad (AE) y estabilidad emulsificante (ES) del concentrado proteínico de semilla de mango.

Figure 3. Effect of pH on the emulsifying activity (AE) and stability (ES) from mango seed proteinic concentrate.

comportamiento similar al de la CE. Mientras que la máxima EE fue de 88.5 % para el CPSM (Figura 3), los valores máximos de esa propiedad para un concentrado proteínico de semillas de zapote mamey (Bernardino-Nicanor *et al.*, 2014) y uno de semilla de jaca (Haque *et al.*, 2020) fueron 70 % y 52 %, respectivamente. La diferencia en las propiedades emulsificantes, como lo es el caso de la CE, de los concentrados proteínicos se deben a distintos factores como son la fuente de proteína, concentración, propiedades superficiales y estructurales, así como del tipo de equipo para la formación de la emulsión (Çelik *et al.*, 2019).

Algunos concentrados o aislados proteínicos tienen la capacidad de espumar y mantener la espuma estable, dependiendo de tipo de proteínas, grado de desnaturalización, pH, temperatura y métodos de obtención (Siddeeg *et al.*, 2014). En la Figura 4 se muestra el efecto dependiente del pH tanto en la CEs como de la EEs del CPSM. Los valores más bajos de CE y EE se encontraron en los intervalos de pH de 4.0-6.0 y 2.0-6.0, respectivamente, siendo de 2.0-3.0 % y 2.0-4.0 %. La CE del CPSM se incrementó bajo condiciones básicas y alcanzó un máximo al pH de 10.0 (36.8 %), lo que pudiera indicar que a pH's alcalinos los valores de CE se deben al aumento de la solubilidad y carga neta de las proteínas, donde las interacciones hidrofóbicas son débiles y la flexibilidad de las proteínas aumenta, lo que a su vez causa una mayor difusión de las proteínas a la interfaz agua-aire para la formación de burbujas de aire y un mejoramiento en la formación de la espuma (Saetae *et al.*, 2011). La CE del CPSM a pH de 10 de este trabajo fue ligeramente superior (35 %) a la del concentrado proteínico de semilla de cereza agria (80 % de proteína) a pH 7 (Çelik *et al.*, 2019), pero 197.8% más alta al del aislado proteínico de semilla de melón (97.8% de proteína) que fue de 18.6 % (Siddeeg *et al.*, 2014). Algunos de los productos alimenticios que requieren como ingrediente a concentrados o aislados proteínicos con alta CE son crema batida, helados, pasteles, coberturas, pan y confituras (Ulloa



Valores con distintas letras (a-e; A-E) son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Values with distinct letters (a-e; A-E) are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$).

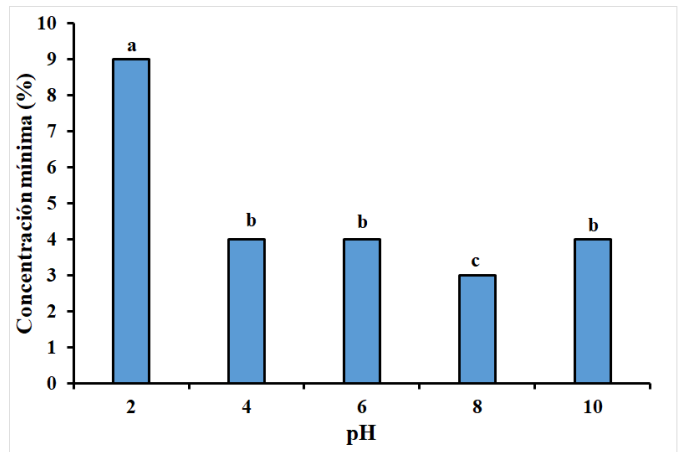
Figura 4. Efecto del pH en la capacidad (CEs) y estabilidad espumante (EEs) del concentrado proteínico de semilla de mango.

Figure 4. Effect of pH on the foaming capacity (CEs) and stability (EEs) from mango seed protein concentrate.

et al., 2017).

La EEs del CPSM también fue dependiente del pH, obteniéndose el máximo de 153 % a pH 10 (Figura 4) y los mínimos a pH's de 2 (4 %), 4 (2 %) y 6 (4 %). Ferzy *et al.* (2014) reportaron que, una vez que se forma la espuma, después de creada la película proteínica alrededor de las burbujas de aire, se debería conseguir la suficiente viscosidad para mantener la EEs y prevenir la ruptura o coalescencia, lo cual se logra a pH's alcalinos en proteínas con altos niveles de aminoácidos hidrofóbicos, como podría ser el caso del CPSM. La EEs del CPSM se encuentran dentro los valores reportados para los aislados proteínico obtenidos de semillas de mamey zapote (95 % de proteína) y de jaca (95.2 % de proteína), en un rango de pH de 2-10, que fueron de 1-30 % (Bernardino-Nicanor *et al.*, 2014) y 68-164 % (Ulloa *et al.*, 2017), respectivamente.

Otra de las propiedades tecno-funcionales de los concentrados o aislados proteínicos es la capacidad de formación de un gel en términos de la mínima concentración requerida (CMG), siendo mejor cuando dicha concentración es más baja. Los fenómenos asociados a la formación de un gel son la desnaturalización parcial y agregación de las proteínas, lo que produce una exposición de sus grupos reactivos internos y el mejoramiento en la retención de agua en la estructura de la red tridimensional (Withana-Gamge *et al.*, 2010). La Figura 5 muestra el efecto del pH en la CMG del CPSM, siendo la más baja de 3.0 % a pH 8, la cual es inferior a la de los concentrados proteínicos de semilla de cereza agria de 8 % a pH 7 (Çelik *et al.*, 2019) y de semilla de jaca de 12 % (Haque *et al.*, 2020). Los concentrados o aislados proteínicos con una alta propiedad gelificante resultan muy importantes como ingredientes en productos cárnicos emulsionados, por ejemplo, salami y salchichas (Ulloa *et al.*, 2011).



Valores con distintas letras (a-c) son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Values with distinct letters (a-c) are significantly different (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figura 5. Efecto del pH en la concentración mínima gelificante (CMG) del concentrado proteínico de semilla de mango.

Figure 5. Effect of pH on the least gelation concentration (CMG) from mango seed protein concentrate.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que es posible obtener un concentrado proteínico por extracción alcalina y precipitación isoeléctrica, seguido de extracciones alcohólicas, a partir de las semillas de mango de la variedad Keitt. Las propiedades tecno-funcionales de CAAg, CAAc, CE y CMG del CPSM resultaron mejores que la de algunos concentrados y aislados proteínicos obtenidos de las semillas de otras frutas, lo que sugiere su potencialidad como ingrediente en la formulación de productos alimenticios para consumo humano.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Mexifrut, S. A. de C.V. el haber proporcionada el lote de semillas de mango para la realización del presente estudio.

REFERENCIAS

- Adenekan, M.K., Fadimu, G.J., Odunmbaku, L.A., Nupo S.S., Oguntoyinbo S.I. y Oke, E.K. 2017. Chemical and functional characterization of baobab (*Adansonia digitata* L.) seed protein concentrate using alcohol extraction method. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*. 2:2554-2558.
- Anil Kumar, D. y Sucharihta, K.V. 2018. Assay of valuable components in by-products of mango industry in Chittoor district, Andhra Pradesh. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 3:56-59.
- AOAC. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
- Arora, A., Banerjee, J., Vijayaraghavan, R., MacFarlane, D. y Patti, A.F. 2018. Process design and techno-economic analysis of an integrated mango processing waste biorefinery.

- Industrial Crops & Products.116:24-34.
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H. y Ghorbel, D. 2016. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. Food Chemistry. 194:1056-1063.
- Bernardino-Nicanor, A., Bravo-Delgado, C.H., Vivar-Vera, G., Martínez-Sánchez, G.E., Pérez Silva, A., Rodríguez-Miranda, J. y Vivar-Vera, M.A. 2014. Preparation, composition, and functional properties of a protein isolate from a defatted mamey sapote (*Pouteria sapota*) seed meal. CyTA-Journal of Food. 12:176-182.
- Biswas, B. y Sit, N. 2020. Effect of ultrasonication on functional properties of tamarind seed protein isolates. Journal of Food Science and Technology. 57:2070-2078.
- Blancas-Benitez, F.J., Avena-Bustillos, R.J., Montalvo-González, E., Sáyago-Ayerdi, S.G. y McHugh, T.H. 2015. Addition of dried 'Ataulfo' mango (*Mangifera indica* L) by-products as a source of dietary fiber and polyphenols in starch molded mango snacks. Journal of Food Science and Technology. 52:7393-7400.
- Boye, J., Fatemeh Zare, F. y Pletch, A. 2010. Pulse proteins: Processing, characterization, functional properties. Food Research International. 43:414-431.
- Çelik, M., Güzel, M. y Yildirim, M. 2019. Effect of pH on protein extraction from sour cherry kernels and functional properties of resulting protein concentrate. Journal of Food Science and Technology. 56:3023-3032.
- Cheok, C.Y., Mohd Adzahan, N., Abdul Rahman, R., Abedin, N.H.Z., Hussain, N., Sulaiman, R. y Hean, G. 2018. Current trends of tropical fruit waste utilization. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 58:335-361.
- Coşkun, Ö. y Gülseren, İ. 2020. Aqueous extraction and functionality of protein concentrate manufactured from cold press meals of pumpkin, pomegranate, and grape seed. Nutrire. 45:11. <https://doi.org/10.1186/s41110-020-00114-4>.
- de Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., Zacarias, L., Rodrigo, M.J., Sáyago Ayerdi, S., Blancas Benítez, F.J., Domínguez Avila, J.A. y Gonzalez-Aguilar, G.A. 2018. Effects of two different drying methods (freeze-drying and hot air drying) on the phenolic and carotenoid profile of 'Ataulfo' mango byproducts. Journal of Food Measurement and Characterization. 12:2145-2157.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. FAO-Stat. [Consultado el 26 de mayo de 2020]. 2020. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#home>.
- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. y Varidi, M.J. 2015. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. Journal of the Science of Food and Agriculture. 95:3165-3176.
- Flores-Jiménez, N.T., Ulloa, J.A., Urías Silvas, J.E., Ramírez Ramírez, J.C., Rosas Ulloa, P., Bautista Rosales, P.U., Silva Carrillo, Y. y Gutiérrez Leyva, R. 2019. Effect of high-intensity ultrasound on the compositional, physicochemical, biochemical, functional and structural properties of canola (*Brassica napus* L.) protein isolate. Food Research International. 121:947-956.
- Guo, Q., Su, J., Yuan, F., Mao, L. y Gao, Y. 2019. Preparation, characterization and stability of pea protein isolate and propylene glycol alginate soluble complexes. LWT-Food Science and Technology. 101:476-482.
- Haque, M.A., Akter, F., Rahman, H. y Baqui, M.A. 2020. Jackfruit seeds protein isolate by spray drying method: The functional and physicochemical characteristics. Food and Nutrition Sciences. 11:355-374.
- Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N. y Karboune, S. 2018. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. Food Chemistry. 254:367-376.
- Kaur, M., Punia, S., Singh Sandhu, K. y Ahmed, J. 2019. Impact of high pressure processing on the rheological, thermal and morphological characteristics of mango kernel starch. International Journal of Biological Macromolecules. 140:149-155.
- Kaushik, P., Dowling, K., McKnight, S., Barrow, C.J., Wang, B. y Adhikari, B. 2016. Preparation, characterization and functional properties of flax seed protein isolate. Food Chemistry. 197:212-220.
- Lam, R. S. H. y Nickerson, M. T. 2013. Food proteins: A review on their emulsifying properties using a structure-function approach. 2013. Food Chemistry. 141: 975-984.
- Li, M., Wen, X., Peng, Y., Wang, Y., Wang, K. y Ni, Y. 2018. Functional properties of protein isolates from bell pepper (*Capsicum annuum* L. var. *annuum*) seeds. LWT-Food Science and Technology. 97:802-810.
- Lieba, V.M., Schuster, L.K., Kronmüllera, A., Schmarr, H.G., Carle, R. y Steingass, C.B. 2019. Fatty acids, triacylglycerols, and thermal behaviour of various mango (*Mangifera indica* L.) kernel fats. Food Research International. 116:527-537.
- López, D.N., Galante, M., Raimundo, G., Spelzini, D. y Boeris, V. 2019. Functional properties of amaranth, quinoa and chia proteins and the biological activities of their hydrolyzates. Food Research International. 116: 419-429.
- Mechmeche, M., Kachouri, F., Chouabi, M., Ksontini, H., Setti, K. y Moktar Hamdi, M. 2017. Optimization of extraction parameters of protein isolate from tomato seed using response surface methodology. Food Analytical Methods. 10:809-819.
- Mohan, N. y Mellem, J.J. 2020. Functional properties of the protein isolates of hyacinth bean [*Lablab purpureus* (L.) Sweet]: An effect of the used procedures. LWT-Food Science and Technology. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109572>.
- Piornos, J. A., Burgos-Díaz, C., Ogura, T., Morales, E., Rubilar, M., Maureira-Butler, I. y Salvo-Garrido, H. 2015. Functional and physicochemical properties of a protein isolate from AluProt-CGNA: A novel protein-rich lupin variety (*Lupinus luteus*). Food Research International. 76:719-724.
- Rico, X., Gullon, B., Alonso, J.L. y Yanez, R. 2020. Recovery of high value-added compounds from pineapple, melon, watermelon and pumpkin processing by-products: An overview. Food Research International. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109086>.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria. [Consultado 18 de Mayo 2020] 2020. Disponible en :http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do.
- Saetae, D., Kleekayai, T., Jayasena, V. y Suntornsuk, W. 2011. Functional properties of protein isolate obtained from physic nut (*Jatropha curcas* L.) seed cake. Food Science and Biotechnology. 20:29-37.
- Siddeeg, A., Yanshun-Xu, Qixing-Jiang y Wenshui-Xia. 2014. Physicochemical and functional properties of flour and protein isolates extracted from seintat (*Cucumis melo* var. *tibish*) seeds. Food Science and Biotechnology. 23: 345-353.
- Stone, A.K., Karalash, A., Tyler, R.T., Warkentin, T.D. y Nickerson, M.T. 2015. Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars.

- Food Research International.76:31-38.
- Torres-León, C., Rojas, R., Contreras-Esquivel, J.C., Serna-Cock, L., Belamres-Cerda, R.E. y Aguilar, C.N. 2016. Mango seed: Functional and nutritional properties. Trends in Food Science & Technology. 55:109-117.
- Ulloa, J.A., Rosas-Ulloa P. y Ulloa-Rangel B. E. 2011. Physicochemical and functional properties of a protein isolate produced from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) meal by ultrafiltration. Journal of the Science Food and Agriculture. 91:572-577.
- Ulloa, J.A., Villalobos Barbosa, M.C., Rezendiz Vazquez, J.A., Rosas Ulloa, P., Ramírez Ramírez, J.C., Silva Carrillo, Y. y González Torres, L. 2017. Production, physico-chemical and functional characterization of a protein isolate from jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seeds. Cyta-Journal of Food. 15:497-507.
- Wang, J.S., Wang, A.B., Zang, X.P., Tan, L., Xu, B.Y., Chen, H.H., Jin, Z.Q. y Ma, W.H. 2019. Physicochemical, functional and emulsion properties of edible protein from avocado (*Persea americana* Mill.) oil processing by-products. Food Chemistry 288:146-153.
- Wani, I.A., Sogi, D., Shivhare, U.S. y Gill, B.S. 2015. Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein isolates. Food Research International. 76:11-18.
- Wani, A. A., Sogi, D. S., Singh, P., y Shivhare, U. S. 2011. Characterization and functional properties of watermelon (*Citrullus lanatus*) seed protein isolates and salt assisted protein concentrates. Food Science and Biotechnology 20: 877-887.
- Withana-Gamage, T.S., Wanasundara, J.P.D., Pietrasik, Z. y Shand, P.J. 2011. Physicochemical, thermal and functional characterisation of protein isolates from Kabuli and Desi chickpea (*Cicer arietinum* L.): A comparative study with soy (*Glycinemax*) and pea (*Pisum sativum* L.). Journal of the Science of Food and Agriculture. 91:1022-1031.

Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico

Antagonismo micoparasítico de una cepa de *Trichoderma harzianum* aislada de plantas de plátano en Oaxaca, México

Ana Claudia Sánchez-Espinosa¹, José Luis Villarruel-Ordaz¹, Luis David Maldonado-Bonilla^{2*}

¹ Instituto de Genética. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Carretera Vía Sola de Vega S/N. 71980. San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca. Mexico.

² CONACYT-Instituto de Genética. Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Carretera Vía Sola de Vega S/N. 71980. San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca. Mexico

ABSTRACT

Bananas are important crops in developing countries with tropical climate. In Mexico, the banana production has increased, and it must be guaranteed. The Panama disease, caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* threatens the current banana production, for what is necessary to implement methods to protect this crop. Fungi from genus *Trichoderma* are natural residents of the rhizosphere, which comprises mycoparasite species used to control diseases caused by phytopathogenic fungi, and also benefit plant development. Here, we report a novel *Trichoderma harzianum* strain identified by optical microscopy and by DNA sequencing of 3 *loci*. The antagonistic capacity towards causal fungi of Panama disease was demonstrated by *in vitro* confrontation assay and co-inoculation in roots of 'plátano manzano' plants. Therefore, this fungus can be enabled to obtain organic formulations for biological control that contribute to produce pathogen-free plants and healthy and high quality fruits.

Keywords: Biological control, Panama disease, phytopathogen, plant health

RESUMEN

Los bananos son cultivos de importancia en países en vías de desarrollo con clima tropical. En México, la producción de banano se ha incrementado y debe de garantizarse. La enfermedad de Panamá causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* pone en riesgo producción actual de bananos, por lo que es necesario implementar métodos para proteger este cultivo. Hongos del género *Trichoderma* son residentes naturales de la rizosfera. Este género comprende especies micoparásitas que se han usado para controlar enfermedades causados por hongos fitopatógenos y que además benefician el desarrollo de las plantas. Es este reporte presentamos una nueva cepa de *Trichoderma harzianum* identificada por observaciones de microscopía óptica y secuenciación de 3 *loci*. Mediante ensayos de confrontación *in vitro* y co-inoculación en raíces de plátano manzano se demostró su capacidad antagonista sobre hongos causales de enfermedad de Panamá. Por lo tanto, este hongo puede ser

empleado para obtener formulaciones de control biológico que contribuyan a producir de plantas libres de patógenos y frutos sanos de alta calidad.

Palabras clave: Control biológico, enfermedad de Panamá, fitopatógeno, sanidad vegetal,

INTRODUCTION

Production of bananas and plantains (*Musa* sp.) is a significant income in countries with tropical climate in Latin America, the Caribbean, Africa and southeastern Asia. In 2018, global gross export is estimated in 19.2 millions of tons (FAO 2018). In 2018, Mexico produced 2.8 millions tons in Chiapas, Tabasco, Veracruz and other states of the Pacific coastline such as Oaxaca (SIAP 2018). Out of the 2.8 millions of tons produced in Mexico, 0.5 were exported, but exports increase year after year because of a trade agreement with China (Gobierno de México 2020).

The Panama disease, caused by the ascomycete fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*) is the more influential factor that has affected the banana production (Ordóñez et al., 2015). Based on the banana host cultivar infected, *Foc* is classified into 4 races, being *Foc* tropical race 4 (*FocTR4*) (aka *Fusarium odoratissimum*) the most aggressive one that infects a broad range of cultivars, including plants from the Cavendish group, the most consumed cultivar world-wide (Fourie et al., 2011). *FocTR4* was recently identified in Colombia (García-Bastidas et al., 2020). The fields of Mexico have been free of *FocTR4*, but the dispersion of *FocTR4* in Latin America is unavoidable, which implies future decrease in banana production.

Trichoderma comprises soil-borne and endophytic fungal species with antibiotic and mycoparasitic activities (Mukherjee et al., 2013) *Trichoderma* spp. also facilitate nutrient uptake, produces plant hormones that benefit plant development and enhances molecular responses to biotic and abiotic stress (Contreras-Cornejo et al., 2016). Formulations based on *T. asperellum*, *T. atroviridae*, *T. virens* and *T. harzianum* are commercially available and used in agriculture (Woo et al., 2014).

*Autor para correspondencia: Luis David Maldonado Bonilla
 Correo electrónico: maldonado@zicatela.umar.mx

Recibido: 17 de junio de 2020

Aceptado: 12 de agosto de 2020

Production of toxic secondary compounds from distinct metabolic pathways produced by *Trichoderma* spp. contribute to suppress the growth of neighbor phytopathogenic fungi at the soil or rhizosphere (Keswani *et al.*, 2014). Mycoparasitism is another biological feature of *Trichoderma* that influences fungal population in soil and rhizosphere. *Trichoderma* can form hook-like structure attached to hyphae of other fungi referred to as 'prey'. Physical pressure derived from the hook-like structures and the activity of cell wall degrading allows acquisition of carbon and nitrogen sources from the prey (Harman *et al.*, 2004).

T. harzianum (teleomorph: *Hypocrea lixii*) can colonize the epidermis and the outer cortex of cucumber roots (Yedidia *et al.* 2001). While interacting with roots, *Trichoderma* stimulates the execution of the induced systemic resistance (ISR) that strengthen the defense responses (Martínez-Medina *et al.*, 2013) jasmonic acid (JA). Besides the antagonistic activity, *Trichoderma* spp. produce hormones such as auxins that boost plant growth (Contreras-Cornejo *et al.* 2009).

Due to the need to sustain the production of banana fruits in Mexico, it is necessary to prospecting biocontrol agents, native from the crop area. Here, we report the identification of a potential biocontrol agent isolated from pseudostems of "platano macho" (*Musa* sp. AAB) grown in the coast of Oaxaca. Sequencing of the *internal transcribed spacer (ITS)*, *large subunit ribosomal DNA (LSU)* and the *transcription elongation factor-1 α (TEF-1 α)* confirmed the specie as *T. harzianum*. The results validated its beneficial effects and suggest that the exploration of plant-associated microbial communities is a reliable first step to develop novel products of crop protection.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of a novel *Trichoderma* strain

The strain was isolated from fragments of pseudostems coming from 'plátano macho' (*Musa* sp. AAB cv. Macho) at the municipality of Villa de Tututepec de Melchor Ocampo, Oaxaca, Mexico (16° 08'N, 97° 36' W) in parallel of the experiments of isolation of *Fusarium* spp. previously reported (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2019). Cut and washed tissue samples of approximately 0.5 × 0.5 cm were disinfected with 70% ethanol for 1 min, 3% sodium hypochlorite for 10 min, and then, were rinsed three times with sterile distilled water. The pieces of disinfected plant tissue were placed in Potato Dextrose Agar (PDA) plates and incubated for 1 week at room temperature. A fast growing mycelium of white color coming from one of the pieces were transferred to fresh PDA plates, after 1 week, mycelium turns dark green and a concentric ring is formed due to the production of conidia. This fungus was denominated M110, and after identification it was consequently referred to as *ThM110*. Conidia from one PDA plate were harvested with glycerol 50% to store at -80 °C. Morphology was visualized by optical microscopy and lactophenol-cotton blue staining.

Polymerase chain reaction

Extraction of genomic DNA from *ThM110* was performed following the protocol reported to isolate DNA of *Fusarium* spp. (Lin *et al.*, 2009). After extraction, DNA was diluted and subject to PCR by using MyTaq^R (Bioline). Amplification of *ITS* was performed by using the universal primer combination ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') under the following conditions: 5 min at 95 °C of initial denaturation; 35 cycles of 94 °C for 30 s (denaturation), 55 °C for 60 s (annealing) and 72 °C for 60 s (extension); final extension of 5 min at 72 °C. Amplification of a *LSU* fragment was performed with the primer combination LROR (5'-ACCCGCTGAACCTAAGC-3') and LR5 (5'-TCCTGAGGGAACTTCG-3') by the following protocol: 5 min at 95 °C of initial denaturation; 35 cycles of 94 °C for 60 s (denaturation), 51 °C for 60s (annealing) and 72 °C for 60 s (extension); final extension of 5 min at 72 °C. The amplification of the *TEF-1 α* fragment was performed with the primer combination tef71f (5'-CAAAATGGGTAAAGAGGASAAGAG-3') and tef997R (5'-CAGTACCGGCRGCRATRATSAG-3'). The 'touchdown' amplification program was 4 min of initial denaturation at 94 °C; 4 cycles each of 60 s at 94 °C (denaturation), 90 s at 70 °C (annealing) and 90 s at 72 °C (extension); followed by 26 cycles with annealing temperature decreasing by 0.5 °C per cycle from 68 °C to 55 °C, followed by 12 cycles with annealing at 55 °C; and with a final extension of 7 min at 72 °C. These PCR conditions are available in the website of the International Subcommittee on *Trichoderma* and *Hypocrea* Taxonomy (http://www.isth.info/isth/methods/method.php?method_id=9) and has been validated at least in another study (Jiang *et al.* 2016) Ascomycota. Amplification of PCR products was confirmed by agarose gel electrophoresis stained with Eco-Stain (Biobasic).

Cloning of *TEF-1 α*

We decided to clone the *TEF-1 α* amplicon since it is longer than 900bp which could hinder the full sequencing by using the above mentioned tef71f and tef997R. After the amplification, the PCR product was cloned into pGEM T-Easy (Promega) following the manufacturer's instructions. Ligation products were used to transform chemically competent *E. coli* JM109 cells. The transformation reactions were plated out in LB agar supplemented with 100 mg mL⁻¹ ampicillin, 10 μ L of 100mM IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) and 50 μ L of 20 mg μ L⁻¹ of X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Plasmids of white colonies were extracted and digested with *EcoRI* to screen for clones carrying the *TEF-1 α* PCR product. The plasmid of the selected colony (pGEM-*TEF-1 α*) was purified with the QIAPrep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

DNA sequencing and analysis

The amplicons of the *ITS* and *LSU* regions were directly sequenced by capillary electrophoresis using the primers mentioned for the PCR. The purified pGEM- *TEF-1 α* was sequenced by capillary electrophoresis with the primers

T7promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') and SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'), both of them are suitable for the sequencing of DNA cloned into pGEM-T-Easy. Sequencing service was provided by Macrogen (<https://dna.macrogen.com/eng/index.jsp>). After the assembly of the full sequences, they were used as queries to search for nearest matches in Genbank using the BLASTN algorithm optimized for highly similar sequences in the nucleotide collection database (nr/nt) of the National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequences were considered conspecific when the percentage of identity was higher than 97% between a given record and our queries (Ávila-Díaz *et al.*, 2013). The sequences of *ITS*, *LSU* and *TEF-1 α* were submitted to Genbank with the accession numbers MN555334.1, MT549065.1 and MN557854.1, respectively.

***In vitro* antagonistic activity**

In vitro confrontation assays were performed to get a first insight into the antifungal capabilities of M110. The growth of the wilting-causing strains M1a, M5, M7, M104 and M108 of *Fusarium* spp. (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2019) a sampling was performed in symptomatic plantains growing in fields of Oaxaca, a coastal southern state of Mexico. A phylogenetic analysis based on the sequences of *TEF 1- α* and *IGS* revealed that three isolates belonged to the *Fusarium oxysporum* species complex, while two other isolates were identified as members of the *Fusarium fujikuroi* species complex. Furthermore, isolates from the same complex shared the same *ITS2* sequence. Inoculation using spores of each isolate on the roots of *Musa* sp. AAB cv. Manzano produced wilting symptoms of varying severity, suggesting that the *Fusarium* wilt might not be caused only by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. PCR-based detection of Secreted in Xylem (*SIX*) was determined in the presence of M110. *Fusarium* spp. and M110 spores were spread in PDA plates and incubated at 28°C for one week. After this period, the mycelia cover the whole plate. Squares of 0.5 cm² of newly grown mycelium from each phytopathogen were inoculated close to the margin of a 10 cm diameter Petri dish with PDA. At the opposite margin of the same Petri dish, a similar square of newly grown mycelium of M110 was inoculated. A Petri dish only inoculated with the phytopathogens were used as negative controls. The growth of phytopathogens was recorded at 7 days after inoculation. Every assay included three technical replicates and was repeated three times. The percent of growth was calculated by dividing the growth of the phytopathogen in presence of *Th*M110 by the growth of the phytopathogen alone (Askew and Laing, 1994).

Assessment of plant protection

Musa sp. AAB cv. 'manzano' ('plátano manzano') plants used for this assay were developed by following the *in vitro* micropropagation method established in our workgroup (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2019) a sampling was performed in symptomatic plantains growing in fields of Oaxaca, a coastal southern state of Mexico. A phylogenetic analysis based on

the sequences of *TEF 1- α* and *IGS* revealed that three isolates belonged to the *Fusarium oxysporum* species complex, while two other isolates were identified as members of the *Fusarium fujikuroi* species complex. Furthermore, isolates from the same complex shared the same *ITS2* sequence. Inoculation using spores of each isolate on the roots of *Musa* sp. AAB cv. Manzano produced wilting symptoms of varying severity, suggesting that the *Fusarium* wilt might not be caused only by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. PCR-based detection of Secreted in Xylem (*SIX*). *In vitro* rooted plants produced by this method were transferred into covered plastic containers with vermiculite rinsed with 25% MS solution without sucrose, and incubated at 26 °C with a 16 h light and 8 h darkness photoperiod. The covers of the containers were gradually removed to prevent dryness. After three weeks of incubation, the plants already had cuticle and produced two newly emerging leaves. Then, the plants were taken from the plastic container. The two older leaves formed during the *in vitro* micropropagation were excised, and the roots were thoroughly washed with water to eliminate the vermiculite. In parallel, the M110 conidia were harvested with sterile distilled water from a Petri dish with one week-old cultures grown in PDA. The suspension was adjusted to 10⁶ conidia mL⁻¹. Twenty plants were inoculated with M110 by submerging the roots into the conidia suspension for 1 min. Additional 20 plants were mock-treated with water. Later on, 10 plants inoculated with M110 and 10 mock-treated plants were infected by adding 10 mL of a *Fusarium* sp spores suspension. M5 adjusted to 10⁶ conidia mL⁻¹. The growth of *Fusarium* sp. M5 and preparation of spore suspension was performed as mentioned above for M110. Out the remaining plants, 10 were reference plants inoculated with M110 and 10 plants only inoculated with water were kept as additional testing conditions. Symptoms were recorded 10 weeks after inoculation by sorting plants into 4 categories: Healthy, yellow leaves, yellow leaves with partial necrosis and necrosis in whole leaves (Maldonado-Bonilla *et al.*, 2019). The experiment was repeated twice.

RESULTS AND DISCUSSION

T. harzianum is a cosmopolitan fungus found as saprophyte in soils, rotting plants, wood, bark as well as associated with living organisms such as plants and other fungi (Chaverri *et al.*, 2015). A close interaction between *T. harzianum* strain T-2013 and cucumber roots induces defense responses, solubilizes phosphate and increases its concentration in roots and shoots, which in turns enhances the plant growth (Yedidia *et al.*, 2001). The detection of different *T. harzianum* strains in roots, stems, leaves and plumules of cacao plants suggests its adaptation to set an endophytic growth and a tight interaction with plants (Bailey *et al.*, 2008). Furthermore, *T. harzianum* as one of the species most commonly isolated as endophytes in the sapwood of tropical trees (Almeida *et al.*, 2018), which might be an indirect evidence of translocation *in planta*. Such conserved feature of this species might be the crucial factor to isolate M110 from living pseudotems of 'plátano macho'.

Lactophenol-cotton blue staining was performed in order to identify the M110 species. *Trichoderma harzianum* M110 is recognized in PDA culture medium for its rapid growth and its yellow-green coloration with concentric growth rings formed by the production of conidia. Microscopically, it is characterized by erect, hyaline conidiophores with bottle-shaped phialides (5.5 -) 6-6.8 (-8.5) μm in length and (1.5-) 1.6-1.7 (-2.8) μm in the upper part (Figure 1A). The conidia are hyaline to slightly greenish in KOH (5%), subglobose to slightly oblong, 2.4-2.9 (-3.3) X (2.0-) 2.3-2.7 μm , with a smooth wall (Figure 1B). The description agrees with that made by Gamms and Bissett (2002). This morphology suggested that the isolated specie is *T. harzianum*.

T. harzianum and closely-related species such as *T. guizhouense*, *T. lixii*, and *T. inhamatum* form the *T. harzianum* species complex (THSC). It is proposed that every species of the THSC has a unique geographic distribution, for example *T. harzianum* is distributed in North America and Europe, while *T. inhamatum* is distributed in South America. In this context, the location of the isolation of M110 (the Pacific coastline of Mexico) agrees with the expected distribution of this species (Chaverri *et al.*, 2015).

A bias in the distribution of the species of the THSC might be influenced by the climate conditions, soil composition and the plant diversity that can allow of the endophytic growth. Members of THSC share a quite similar morphological characters, thus, additional criteria such as sequencing of phylogenetically informative loci are necessary to define the species. The *ITS* is considered the fungal barcode sequence (Ratnasingham and Hebert 2007). The full *ITS* sequence is composed by the 5.8S ribosomal gene flanked by the region *ITS1* at the 5' and the *ITS2* at the 3' (Pryce *et al.*, 2003). *ITS1* and *ITS2* are transcribed together with the rest ribosomal operon including the 18S (*SSU*), 5.8S and the 28S (*LSU*) rRNAs. During maturation of rRNAs, the *ITS1* and *ITS2* are degraded. The *LSU* sequence is used as a marker for fungal molecular taxonomy, but, due to the lack of evolutionary pressure, most of the polymorphisms are located into the *ITS1* and *ITS2*.

The full *ITS* and a fragment derived from the *LSU* were amplified by PCR and sequenced. Both sequences were

submitted as query in Genebank to search for highly similar sequences by using the BLASTN algorithm. Table 1 shows the two matches of highest identity. The values of percent identity above 99% suggest the identified species is *T. harzianum*. In order to discriminate between members of the THSC and confirm the identity of M110, a fragment of the *TEF-1 α* gene was amplified, cloned and analyzed. The sequenced *TEF-1 α* fragment of M110 was subject to the workflow used to analyze *ITS* and *LSU*. The results are presented in Table 1. The best matches correspond to collection strains *T. harzianum*, thus, M110 is a novel strain of *T. harzianum* isolated from pseudostems of banana. To our knowledge, this is the first report is this species associated to banana plants in Mexico.

We performed confrontation assays in order to demonstrate its potential antagonistic activity. M110 and 5 strains of phytopathogenic *Fusarium* spp. were co-inoculated in PDA. Negative controls of PDA plates solely inoculated with the phytopathogens were run in parallel. After 4 days, when fungi start to touch each other, the growth of *Fusarium* spp. slightly decrease in the presence of M110 (data not shown), and the difference is enhanced at 7 days post inoculation when M110 covers the plate and the growth of *Fusarium* spp. is fully arrested. The results of representative plates after 7 days of inoculation are shown in Figure 2. Table 2 shows the results of *Fusarium* spp. growth percentage in the presence of M110. A scale of 5 classes based on the phytopathogen growth percentage with *Trichoderma* respect to the phytopathogen growth alone is recommended to rank the antagonism (Askew and Laing, 1994). The Class 1 is the most effective and does not allow the growth of the phytopathogen. In Class 2, the pathogen growth is up to 25%, in Class 3, the pathogen growth reaches up to 50%. In Class 4, both fungi locked at the point of contact; and Class 5 indicates the phytopathogen entirely grew in the medium, inhibiting the *Trichoderma* growth. The results of the *Fusarium* spp. growth percentage in the presence of M110 are shown in Table 2. The interactions M1a vs. M110, M5 vs. M110, M7 vs. M110 and M108 vs. M110 displayed quite consistent results below 50% of growth. The interaction M104 vs. *Th*M110 gave high standard deviation, but the inhibition is visually evident. Therefore, M110 is associated to the Class 3 of antagonism.

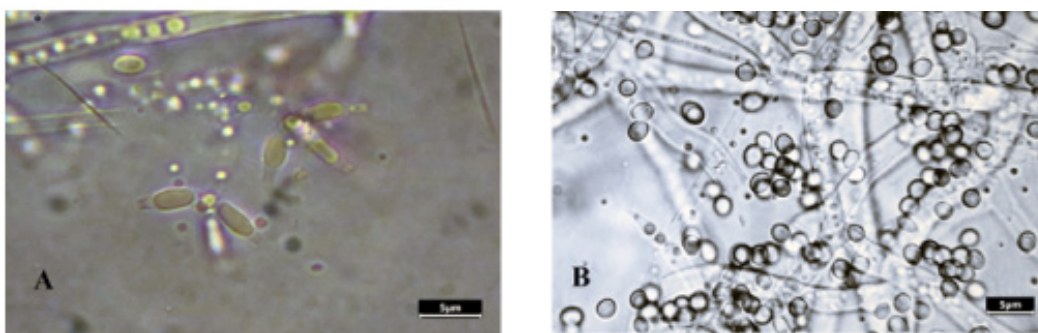


Figure 1. Optical microscopy reveals that M110 has characteristic features of *T. harzianum*. **A)** Bottle-shaped phialides. **B)** Subglobose to slightly oblong conidia. Bar: 5 mm.

Figure 1. Microscopía óptica revela que la cepa M110 tiene características típicas de *T. harzianum*. **A)** Fiálides con forma de botella. **B)** Conidios subglobosos a ligeramente oblongos. Barra: 5 mm.

Table 1: Identity of the full length sequence *ITS*, and the derived fragments from *LSU* and *TEF-1 α* of M110. The first two sequences of highest percent identity and coverage are shown. The access numbers of the corresponding sequences are indicated at the far right column.

Tabla 1. Identidad de la secuencia completa *ITS* y de los fragmentos derivados de *LSU* y *TEF-1 α* de la cepa M110. Se muestran las primeras 2 secuencias con mayor porcentaje de identidad y cobertura. Los números de acceso de las correspondientes secuencias se indican en la última columna de la derecha.

Sequence	% Identity	% Coverage	E-value	Closest species match	Accession number
ITS	99.68	100	0	<i>T. harzianum</i> NECC30498	MH153641.1
	99.68	100	0	<i>T. harzianum</i> AA1110F1	KX421472.1
LSU	99.88	100	0	<i>T. harzianum</i> CBS 130681	MH877292.1
	99.88	100	0	<i>T. harzianum</i> CBS 226.95	MH874152.1
TEF-1 α	97.30	93	0	<i>T. harzianum</i> (<i>H. lixii</i>) CIB T131	EU279988.1
	96.14	94	0	<i>T. harzianum</i> JBT1244	AY605784.1

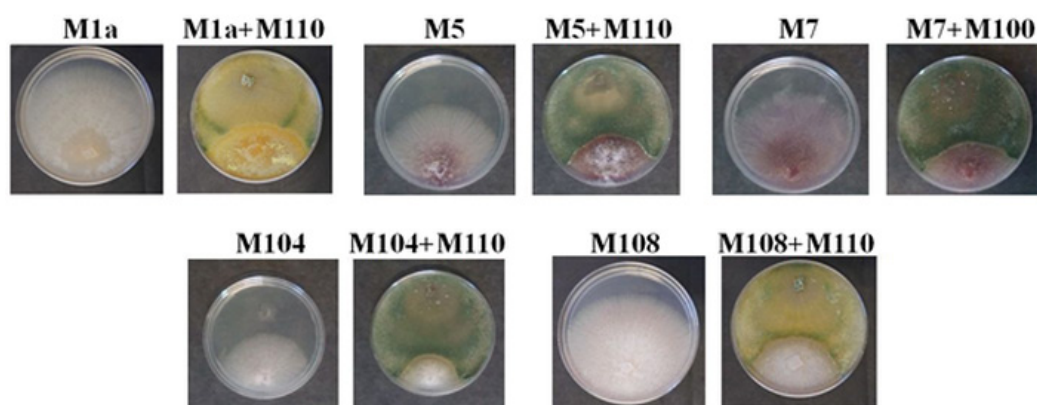


Figure 2. Representative photographs of the confrontation assays *Fusarium* spp. vs. *T. harzianum* M110 show that the mycelial growth of *Fusarium* spp. is inhibited by M110. Plates inoculated only with *Fusarium* were used as controls. The name of the inoculated strains is indicated above each plate. Photographs were taken 7 days post inoculation.

Figura 2. Fotos representativas de ensayos de confrontación *Fusarium* spp. vs. *T. harzianum* M110 muestran que el crecimiento micelial de las cepas de *Fusarium* spp. se inhibe en presencia de M110. Placas inoculadas sólo con *Fusarium* se usaron como controles. El nombre de las cepas inoculadas se indica sobre cada placa. Las fotografías se tomaron 7 días después de la inoculación.

Table 2. Percent of mycelial growth of *Fusarium* spp. in PDA plates co-inoculated with M110 respect to mycelial growth of *Fusarium* spp. in PDA plates without M110. See material and methods for details.

Tabla 2. Porcentaje de crecimiento micelial de *Fusarium* spp. en placas de PDA co-inoculadas con la cepa M110 respecto al crecimiento micelial de *Fusarium* spp. en placas PDA sin M110. Para detalles, ver materiales y métodos.

<i>Fusarium</i> strain	Percent of growth (DAY 7)
M1a	34.85 ± 5.52
M5	37.46 ± 4.20
M7	33.14 ± 5.49
M104	53.05 ± 12.93
M108	29.56 ± 5.26

Infection assays in the presence or absence of M110 were performed to validate the ability of M110 to antagonize causal agents of Panama disease in the soil or rhizosphere. After the *Foc* spore germinate, nascent hyphae adhere to the root epidermis, penetrate, and invade apoplast. When xylem vessels are reached, the fungus is dispersed throughout plant, causing discoloration of the rhizome and yellowing of leaves, and later on browning of the vascular bundles, necrosis and splitting of the pseudostem (Ploetz, 2015). Under our experimental conditions, strain M5 displays the more severe symptoms towards *Musa* sp. AAB cv ‘manzano’. A M5 spores suspension was inoculated in roots of mock plants and plants previously inoculated with M110. The M110 potential protective effect is shown in Figure 3. Strain M5 causes severe wilting of the leaves, but the symptoms notably decreased in plants pre-inoculated with M110 (Figure 3A). By comparing

M110-inoculated and control plants, we suggest that M110 does not cause visual negative effects to *Musa* sp. AAB 'manzano'. Figure 3B shows the distribution of symptoms in the plants grown under these experimental conditions and confirms the pre-inoculation of M110 decreases of wilting of leaves caused by M5. Under these conditions, no further symptoms were detected. Therefore, M110 seems to be innocuous to plants and its inoculation into roots decreases the Panama disease symptoms, possibly by the antagonism characteristic of the *Trichoderma* genus.

Antifungal compounds such as peptabiols, polyketides and terpenes are produced by *Trichoderma* spp (Keswani *et al.*, 2014). Such metabolites might limit the proliferation of other fungi that compete for carbon and nitrogen source and represent a benefit to the plant when phytopathogens are inhibited. Remodeling of the cell wall by the activity of chitinases, glucanases and proteases is required for hyphal growth and branching (Verdín *et al.*, 2019). Those extracellular enzymes can reach the hyphae of neighbor fungi and

restrict their growth. Coiling around fungal host enhances the antagonistic effect of *Trichoderma* (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2018), since physical proximity between *Trichoderma* and host facilitates the effect of antifungal metabolites and the lytic enzymes mentioned above. Therefore, diffusible factors produced by *T. harzianum* M110 and the coiling might contribute to the *in vitro* growth arrest of *Fusarium* spp., and, in the same way, they could obstruct the development of *Fusarium* sp. M5 in the rhizosphere of *Musa* sp. AAB 'manzano'.

Besides the antagonism, *Trichoderma* might elicit mechanisms of protection. Genes encoding biosynthetic enzymes of biotic stress-related plant hormones such as salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA), have been identified in the *T. atroviridae* genome (Guzmán-Guzmán *et al.*, 2018). A number of *Trichoderma*-derived proteins and non-ribosomal peptides can also trigger defense responses such as production of phytoalexins, reactive oxygen species, or induction of genes encoding pathogenesis-related proteins (Ramírez-Valdespino *et al.*, 2019). These reactions have to be

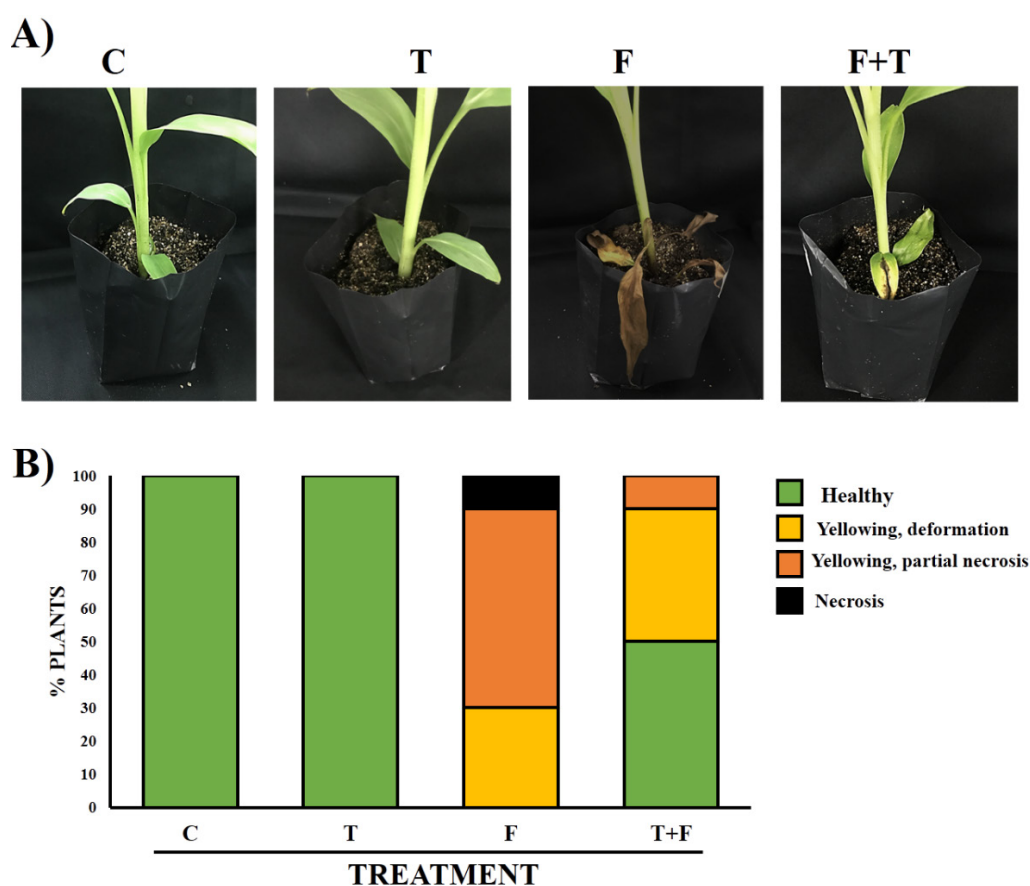


Figure 3. Evidences of the protective effect of M110 against *Fusarium* sp. M5. Spores solutions of M110 and M5 were inoculated in roots of *Musa* sp. AAB cv. 'manzano'. A) The effect is visible in plants 10 weeks after inoculation. B) Plants were classified according to the displayed symptoms of different severity at 10 weeks after inoculation. C, non-inoculated control. T, *T. harzianum* M110. F, *Fusarium* sp. M5. F+T, *T. harzianum* M110 + *Fusarium* sp. M5. See materials and methods for details of the inoculation procedure.

Figura 3. Evidencias del efecto protector de M110 contra *Fusarium* sp. M5. Soluciones de esporas de M110 y M5 se inocularon en raíces de *Musa* sp. AAB. cv 'manzano'. A) Efecto en plantas es visible a 10 semanas después de inoculación. B) Las plantas fueron clasificadas de acuerdo a los síntomas mostrados 10 semanas después de la inoculación. C, plantas control no inoculadas, T, plantas inoculadas con *T. harzianum* M110. F, plantas inoculadas con *Fusarium* sp. M5. F+T, *T. harzianum* M110 + *Fusarium* sp. M5. Ver materiales y métodos para detalles de procedimiento de inoculación.

explored in the future in order to have a better understanding about the protective effect of M110 in 'plátano manzano'. Both SA and JA-dependent signal pathways are stimulated by *T. virens* in tomato plants, and induced resistance against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) (Jogaiah *et al.*, 2018). As the pathogenicity mechanisms of *Foc* and *Fol* are similar, we have to consider the role of the SA and JA pathways in banana, either elicited by hormones produced by the fungus or by molecules that trigger hormone biosynthesis and signaling in the plant. These possibilities can be investigated in M110 and banana plants.

A combination of *T. harzianum* and *Glomus* spp. suppressed the infection of *FocTR4* towards the 'Lakatan' bananas, a top-selling cultivar in Philippines (Castillo *et al.*, 2019). A combined formulation of *T. harzianum* and *Bacillus subtilis* enhances the uptake of minerals and biomass production in swiss chard (Venegas-Gonzalez *et al.*, 2019). That illustrates additional effects of *T. harzianum* that might be investigated in the future for the interaction between M110 and banana plants.

We report here a *T. harzianum* strain isolated from plants growing in southern Mexico, which has features of a biocontrol agent, and it can be efficient to protect plants against Panama disease. Some banana producers have faced disease-related restrictions and bans due to Panama disease (FAO, 2017). Mexico has an important trade to export bananas to China (Gobierno de México, 2020) thus, it is necessary to be alert in securing the plant health and production of pathogen-free bananas.

CONCLUSIONS

Due to the economic importance of banana in Mexico, and the need to sustain the production of fruits, it is necessary to prospecting biocontrol agents native from the soil of the crop area and adapted to interact with cultivars grown in Mexico. Here, we demonstrated the antagonism of *T. harzianum* M110 towards *Fusarium* spp., and demonstrated the potential of this novel strain as biocontrol agent. These findings encourage us to investigate the molecular basis of its antagonism and interaction with plants. Communication between microbiologists, phytopathologists and biotechnologists is necessary to develop large-scale biopesticide products as alternative to protect plants against Panama disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by Universidad del Mar, Grant 2IG1903. LDMB is supported by the Cátedras-CONACYT Program, Project No. 538.

REFERENCES

- Almeida, K.A., Armesto, C., Monteiro, F.P., de Souza, J.T. 2018. Diversity of *Trichoderma* species isolated from dead branches and sapwood of *Theobroma cacao* trees. *Tropical Plant Pathology*. 43: 90-94.
- Askew, D.J., Laing, M.D. 1994. The in vitro screening of 118 *Trichoderma* isolates for antagonism to *Rhizoctonia solani* and an evaluation of different environmental sites of *Trichoderma* as sources of aggressive strains. *Plant and Soil*. 159: 277-281.
- Ávila-Díaz, I., Garibay-Orijel, R. Magaña-Lemus, R.E., Oyama, K. 2013. Molecular evidence reveals fungi associated within the epiphytic orchid *Laelia speciosa* (HBL) Schltr. *Botanical Sciences*. 91: 523-529.
- Bailey, B.A., Bae, H., Strem, M.D., Crozier, J., Thomas, S.E., Samuels, G.J., Vinyard, B.T., Holmes, K. A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*. 46: 24-35.
- Castillo, A., Puig, C., Cumagun, C. 2019. Non-synergistic effect of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* spp. in reducing infection of *Fusarium* wilt in banana. *Pathogens*. 8: 43.
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G.J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*. 107: 558-590.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 149: 1579-1592.
- Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, J., del-Val, E., Larsen, J. 2016. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology*. 92: fiw036.
- FAO. 2017. Banana/Market Review 2015-2016. Food Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/3/a-i7410e.pdf>.
- FAO. 2018. Banana Market Review 2018. Preliminary Results for 2018. 2018. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Bananas/Documents/Banana_Market_Review_Prelim_Results_2018.pdf.
- Fourie, G., Steenkamp, E.T., Ploetz, R.C., Gordon, T.R., Viljoen, A. 2011. Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 533-542.
- Gamms, W., Bissett, J. 2002. Morphology and identification of *Trichoderma*. En: *Trichoderma and Gliocladium* volumen I. Basic biology, taxonomy and genetics. C.P. Kubicek y G.E. Harman (ed.), pp. 3-31. Taylor & Francis, Bristol.
- García-Bastidas, F., Quintero-Vargas, C., Ayala-Vasquez, M., Seidl, M., Schermer, T., Santos-Paiva, M., Noguera, A.M., Aguilera-Gálvez, C., Wittenberg, A., Hofstede, R., Sørensen A. 2020. First report of Fusarium Wilt Tropical Race 4 in Cavendish bananas caused by *Fusarium odoratissimum* in Colombia. *Plant Disease*. 104: 994.
- Gobierno de México. 2020. <https://www.gob.mx/senasica/prensa/inicia-mexico-exportacion-de-platano-a-china-232458>.
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M.D., Olmedo-Monfil, V., Herrera-Estrella, A. 2018. *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. *Phytopathology*. 109: 6-16.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 43-56.

- Jiang, Y., Wang, J.L., Chen, J., Mao, L.J., Feng, X.X., Zhang, C.L., Lin., F.C. 2016. *Trichoderma* biodiversity of agricultural fields in east China reveals a gradient distribution of species. PLoS ONE. 11: e0160613.
- Jogaiah, S., Abdelrahman, M., Phan, L.S., Tran, Ito, S.I. 2018. Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against Fusarium wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. Molecular Plant Pathology. 19: 870-882.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B.K., Singh, S.P., Singh, H.B. 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied Microbiology and Biotechnology. 98: 533-544.
- Lin, Y. H., Chang, J.Y., Liu, E.T., Chao, C.P., Huang, J.W., Chang, P.F.L. 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4. European Journal of Plant Pathology. 123: 353-365.
- Maldonado-Bonilla, L.D., Calderón-Oropeza, M.A., Villarruel-Ordaz, J.L., Sánchez-Espinosa, A.C. 2019. Identification of novel potential causal agents of Fusarium wilt of Musa sp. AAB in southern Mexico. Journal of Plant Pathology & Microbiology. 10: 479.
- Martínez-Medina, A., Fernández, I., Sánchez-Guzmán, M.J., Jung, S.C., Pascual, J.A., Pozo, M.J. 2013. Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. Frontiers in Plant Science 4: 206.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Herrera-Estrella, A., Schmoll, M., Kenerley, C.M. 2013. *Trichoderma* research in the genome era. Annual Review of Phytopathology. 51: 105-129.
- Ordóñez, N, Seidl, M.F., Waalwijk, C., Drenth, A., Kilian, A., Thomma, B.P.H.J., Ploetz, R.C., Kema. G.H.J 2015. Worse comes to worst: Bananas and Panama disease—when plant and pathogen clones meet. PLoS Pathogens. 11: e1005197.
- Ploetz, R.C. 2015. Fusarium wilt of banana. Phytopathology. 105: 1512-1521.
- Pryce, T.M., Palladino, S., Kay, I.D., Coombs, G.W. 2003. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. Medical Mycology. 41: 369-81.
- Ramírez-Valdespino, C.A., Casas-Flores, S., Olmedo-Monfil, V. 2019. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. Frontiers in Microbiology. 10: 1030.
- Ratnasingham, S, Hebert, P.D. 2007. BOLD: The barcode of life data system (<http://www.boldsystems.org>). Molecular Ecology Notes. 7: 355-364.
- SIAP. 2018. Intención de Cosecha 2018. 2018. http://infosiap.siap.gob.mx/opt/agricultura/intencion/Intencion_cosechaPerenne_cultivo2018.pdf.
- Venegas-González, J., Méndez-Inocencio, C., Martínez-Mendoza, E.K., Torres L.F., Rodríguez-Torres M.D. 2019. Producción orgánica de *Beta vulgaris* subespecie cicla con inoculantes microbianos. Biotecnia. 21: 121-126.
- Verdín, J., Sánchez-León, E., Rico-Ramírez, A.M., Martínez-Núñez, L., Fajardo-Somera, R.A., Riquelme, M. 2019. Off the wall: The rhyme and reason of *Neurospora crassa* hyphal morphogenesis. The Cell Surface. 5: 100020.
- Woo, S.L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., Lorito, M. 2014. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. The Open Mycology Journal. 8: 71-126.
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y., Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and Soil. 235: 235-242.



Efecto de la adición de cáscara y semilla deshidratada en la capacidad antioxidante de una pasta de tomate producida en Sinaloa

Effect of the addition of husk and dehydrated seed on the antioxidant capacity of a tomato paste produced in Sinaloa

Nora Estela Ponce Fernández*, Gregorio Pollorena López, Cindy Rosas Domínguez, Sandra Carmina Osuna Izaguirre, Vida Mariel López Peñuelas

Instituto Tecnológico Superior de Guasave. Carretera Internacional Entronque a Brecha s/n, Ejido El Burrioncito, Guasave, Sinaloa, México. CP 81149.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de la adición de semilla y cáscara deshidratada en la capacidad antioxidante de pasta de tomate. Los tratamientos fueron: Pasta control (PC), adicionada con 1 % (P1), 1.5 % (P1.5) y 3 % (P3) del subproducto seco (70 °C/6 h) (SCS). Se evaluó la capacidad antioxidante de 0 hasta la semana 24 de almacenamiento mediante determinación de fenoles totales, DPPH, TEAC y ORAC. El diseño experimental fue ANOVA de una vía y las diferencias entre promedios se evaluaron mediante Tukey ($p \leq 0.05$). El contenido de fenoles totales fue mayor en SCS (58.92±1.29 mgEAG/g) a los demás tratamientos ($p \leq 0.05$), que aumentaron al adicionar el subproducto. La inhibición mayor del radical DPPH fue en SCS, seguido de P3 (67.207±0.52 g/100 g), con relación directa entre la adición del subproducto y la capacidad antioxidante en P1 y P1.5 ($p > 0.05$). La capacidad antioxidante de SCS y P3 en ORAC (53.69±0.41 y 21.52±3.45 $\mu\text{M TE/g}$) fue mayor que en TEAC (14.72±0.50 y 7.24±0.03 $\mu\text{M TE/g}$), con la misma tendencia después de 24 semanas. Fenoles totales, DPPH, TEAC y ORAC disminuyeron respecto al tiempo. La adición de cáscara y semilla deshidratada modifica la capacidad antioxidante que se deteriora con el tiempo. **Palabras clave:** Pasta de tomate, capacidad antioxidante, cascara y semilla de tomate, subproducto

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of the addition dehydrated husk and seed in antioxidant capacity of tomato paste. Control Paste (PC) added with 1 % (P1), 1.5 % (P1.5) and 3 % (P3) of dried byproduct (70 °C/6 h) (SCS) were the treatments. Antioxidant capacity was evaluated at time 0 and week 24 of storage by total phenols, DPPH, TEAC and ORAC determination. The experimental design was one-way ANOVA and the differences between averages were evaluated by Tukey ($p \leq 0.05$). SCS was the highest in total phenolic content (58.92±1.29 mg EAG/g), compared to the other treatments ($p \leq 0.05$), which increased when adding byproduct. SCS had higher DPPH inhibition, followed by P3 (67.207±0.52 %), with a direct relationship between the addition of the by-product and the antioxidant capacity of P1 and P1.5 ($p > 0.05$). The antioxidant capacity of SCS and P3 in ORAC (53.69±0.41 and 21.52±3.45 $\mu\text{M TE/g}$) was higher than

in TEAC (14.72±0.50 and 7.24±0.03 $\mu\text{M TE/g}$), with the same trend after 24 weeks of storage. Total phenols, DPPH, TEAC and ORAC decreased over time. The addition of dehydrated husk and seed modifies the antioxidant capacity that deteriorates over time.

Keywords: Tomato paste, antioxidant capacity, dehydrated husk and seed, byproduct.

INTRODUCCIÓN

El tomate rojo es un fruto que posicionó a Sinaloa como el productor número uno de México hasta 2017 y en 2018, fue el segundo producto más importante en valor de exportaciones agropecuarias mexicanas, con una participación de 12.8 por ciento. El tomate rojo (*Solanum lycopersicum*) es altamente consumido en fresco y procesado, ya que productos como enlatados y pastas de tomate brindan al consumidor la posibilidad de sustituir el fruto en épocas donde no está disponible (Büyükbay *et al.*, 2009), aumentando vida de anaquel, aunado a que, estudios han demostrado fuertes correlaciones inversas entre el consumo de tomate y el riesgo de ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular relacionada con la edad, ya que constituye una excelente fuente de compuestos como vitaminas C y E, licopeno, β -caroteno, luteína y flavonoides como la quercetina (Dorais *et al.* 2008). Se sabe que el 80 % del licopeno proviene del consumo de tomate crudo o de productos derivados. A pesar de los beneficios nutricionales del tomate, Vihna *et al.* (2014) demostraron que la eliminación de cáscara y la semilla, en la industria de procesamiento, tuvieron un efecto considerable sobre las propiedades fisicoquímicas, el contenido de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de los frutos de tomate de cuatro cultivares típicos portugueses. El pelado causó una mayor disminución en el licopeno, el β -caroteno, el contenido de ácido ascórbico y fenólicos (promedios de 71 %, 50 %, 14 % y 32 %, respectivamente) y redujeron significativamente la capacidad antioxidante de las frutas (8 % y 10 %, utilizando ensayos de modelo DPPH y linoleato de β -caroteno, respectivamente). Aunque la eliminación de semillas favoreció el aumento tanto del color como de la dulzura, se perdieron algunos compuestos bioactivos (11 % de carotenoides y 24 % de fenólicos), así como la capacidad antioxidante (5 %). De

*Autor para correspondencia: Nora Estela Ponce Fernández
 Correo electrónico: nponcef.itsg@gmail.com

Recibido: 12 de junio de 2020

Aceptado: 16 de octubre de 2020

forma similar, Perea-Domínguez *et al.* (2018) demostraron que el subproducto del tomate es rico en compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante, y sugirieron la valorización del subproducto industrial del tomate, que de acuerdo a la Planeación Agrícola Nacional 2017-2030 de SAGARPA, una de las estrategias es fomentar la industrialización del producto, lo que podría generar ingresos adicionales para la industria del tomate y reducir el problema de eliminación de desechos. Es por lo anterior, que el propósito de este artículo es evaluar el efecto de la adición de semilla y cáscara deshidratada en la capacidad antioxidante de una pasta de tomate producida en Sinaloa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la pasta de tomate

Se utilizaron tomates saladette (*Solanum lycopersicum* L.), obtenidos en la región de Guasave, Sinaloa, en el ciclo 2018-2019. Se elaboraron cuatro formulaciones: pasta control (PC), pasta adicionada con 1 % (P1), 1.5 % (P1.5) y 3 % (P3) de subproducto de tomate compuesto por cáscara y semilla deshidratada en polvo (SCS). El tomate se desinfectó con NaClO al 0.01 % por 5 min, se escaldó a 90 °C por 2 min, se separó la pulpa de tomate (Pt), de la cáscara y semilla en la despulpadora (SCF) (DF600 3F, JAVAR), y se pesó. Para PC, la pulpa se evaporó en el módulo polivalente de procesamiento (De Lorenzo, DL Lab 50), con una alimentación de vapor a 110 °C y 2 atm por tiempo entre 1 y 3 horas, al final se midieron los °Brix. La semilla y cáscara se secó en un secador de bandejas a 70 °C por 6 h y se pulverizó para agregarse a P1, P1.5 y P3, antes del proceso de evaporación. Posteriormente el producto envasado al vacío se etiquetó, pesó y almacenó a temperatura ambiente.

Preparación de extracto hidrofílico

Por triplicado se pesaron 10 g de las muestras húmedas: Pt (pulpa de tomate), PC, P1, P1.5, P3 y SCF (semilla y cáscara fresca); y 1 g de SCS (semilla y cáscara seca) en una balanza analítica PR 2003 Deltarange, se homogenizó cada muestra (Homogenizador IKA, ultra Turrax) en 20 mL de metanol al 80 % (J.T. Baker), el homogenizado se colocó en un sonicador (Branson 2510) por 30 min y se centrifugó (SIGMA 3-30KS) a 14,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se realizaron 2 lavados adicionales con 10 mL de metanol 80 %, colectando el sobrenadante para filtrarlo en papel Whatman No. 1. Finalmente los extractos obtenidos (Pt, PC, P1, P1.5, P3, SCF y SCS), se llevaron al mayor volumen resultante en muestras húmedas y en muestras secas con metanol 80 % y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en las determinaciones de fenoles totales y capacidad antioxidante (Shivashankara *et al.*, 2004). El procedimiento se repitió a la semana 24.

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales en los extractos hidrofílicos de tomate se determinaron de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965) con algunas modificaciones. La determinación se realizó por triplicado. Se

agregó 50 µL de extracto, 3 mL de H₂O (desionizada) y 250 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N, cada muestra de agitó 8 minutos, y se adicionaron 750 µL de Na₂CO₃ (20 %) y 950 µL de H₂O (desionizada), las muestras se agitaron nuevamente y se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (UV-VIS HACH DR 6000). Los resultados fueron reportados como mg de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) / g de peso seco. El procedimiento se repitió a la semana 24.

DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrácil)

La capacidad de los extractos para inactivar al radical estable DPPH se evaluaron de acuerdo al método propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995). Para la solución stock se mezclaron 2.5 mg de radical DPPH con 100 mL de metanol puro. La solución se ajustó a una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 515 nm. La reacción se llevó a cabo por triplicado donde se agregaron 3.9 mL de radical DPPH y 100 µL del extracto. Las mezclas se agitaron durante 1 minuto y se dejaron reposar en la oscuridad durante 30 minutos. La reducción del radical se determinó a una absorbancia de 515 nm en un espectrofotómetro (UV-VIS HACH DR 6000). La actividad se expresó como porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH. El procedimiento se repitió a la semana 24.

TEAC (Capacidad Antioxidante en Equivalentes Trolox)

El valor de TEAC se determinó a los PC, P1, P1.5, P3 y SCS después de 24 semanas de almacenamiento en condiciones normales, según la técnica de Pellegrini *et al.* (1999), que se basa en la habilidad de los extractos para inactivar el radical ABTS⁺ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)). El radical catión se generó con 19.2 mg de ABTS⁺ disueltos en 5 mL de agua desionizada y 88 µL de K₂S₂O₈ (0.0378 g mL⁻¹). La solución madre se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente por 16 h. Posteriormente, se tomó 1 mL de radical ABTS⁺ activado, se agregó a 88 mL de metanol y se ajustó a 0.7 ± 0.02 (734 nm). Se adicionaron 2970 µL de ABTS⁺ a 30 µL de cada extracto, se monitoreó la absorbancia a 734 nm al minuto 1 y 5 después del mezclado inicial. Los resultados se reportaron como µmoles de equivalentes Trolox (µMET) / g de peso seco.

ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno)

Para Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno (ORAC) se enviaron las muestras (SCS, PC, P1, P1.5 y P3) a un laboratorio externo (CIIDIR IPN Unidad Guasave) para que realizaran los análisis después de 24 semanas de almacenamiento, siguiendo la metodología descrita por Prior *et al.* (2003) con modificaciones de Perea-Domínguez *et al.* (2018). Los extractos previamente disueltos en metanol, se agregaron en el buffer de ORAC (buffer de fosfato de potasio, pH 7.4) y se preparó una curva estándar Trolox (0-30 mg / L). La solución con 87 µM fluoresceína y 70 mM de AAPH (2,20-Azobis (2-amidinopropano) dihi-drocloruro)) se mezcló en el buffer fosfato. Después en una microplaca negra de 96 pozos

con 25 µL del blanco (buffer fosfato), control o muestra y se añadieron 200 µL de solución de fluoresceína. Después se añadió 50 µL de AAPH recién preparada y se incubó a 37 °C. La fluorescencia se registró cada 2 min durante 76 ciclos (longitud de onda de excitación de 485 nm y longitud de onda de emisión de 530 nm) con un DTX 880 detector multimodo, Beckman Coulter (Brea, CA, EE. UU.) Los resultados se reportaron como µmoles de equivalentes Trolox (µM ET) / g de peso seco. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue totalmente aleatorizado y los tratamientos fueron Pt, PC, P1, P1.5, P3, SCF y SCS por triplicado y los datos se evaluaron mediante un ANOVA bajo un diseño al azar de una sola vía, a través de MINITAB 16. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95 %. Se establecieron coeficientes de correlación de Pearson entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los compuestos fenólicos tienen la facilidad de capturar radicales libres lo que les aporta actividad antioxidante y esto es debido a sus características estructurales. La figura 1 muestra el contenido de fenoles totales de los extractos de los tratamientos: Extracto pasta control (PC), extracto de pasta adicionado con 1 % de semilla y cáscara en polvo (P1), extracto de pasta adicionado con 1.5 % (P1.5), extracto de pasta adicionado con 3 % (P3), extracto de pulpa de tomate (Pt), extracto semilla y cáscara fresca (SCF) y, extracto de semilla y cáscara seca (SCS). En figura 1, A representa la medición en la semana 0 de procesamiento y B los resultados después de 24 semanas de almacenamiento en bolsas al vacío y transparentes.

El contenido de fenoles totales en A, mostró que las muestras frescas (Pt=pulpa de tomate; SCF=semilla y cáscara fresca), se comportaron de forma similar a los valores 14.9960 ± 0.9010 mg EAG / g y 14.1630 ± 0.6310 mg EAG / g obtenidos por Zhang *et al.* (2011), quienes mencionaron que en el escaldado, los compuestos fenólicos disminuyeron debido a un proceso de lixiviación; derivado de la destrucción de las paredes celulares y los compartimentos subcelulares (vacuolas y apoplastos) durante la ebullición facilitando la migración de sustancias hidrosolubles hacia el espacio extracelular y de allí al agua de procesamiento. El contenido fenólico fue mayor en SCS ($58.92 / g \pm 1.29$ mg EAG) con diferencia significativa a los demás tratamientos ($p \leq 0.05$), menor a lo reportado por Perea-Domínguez, (2018), quienes analizaron los subproductos de tomate en muestras liofilizadas. Respecto a los tratamientos donde se adicionó cáscara y semilla deshidratada, se encontró una relación directa entre el porcentaje de adición y la concentración de fenoles, lo cual se atribuyó a lo mencionado por Vihna *et al.* (2014), quienes afirman que al retirar la cáscara y semilla se presenta un efecto negativo en la cantidad de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Existen diferentes factores que degradan el contenido de polifenoles en los alimentos a través del tiempo. Vallverdú-Queralt *et al.* (2012) mencionaron que enzimas como la peroxidasa se involucran en la degradación oxidativa de compuestos fenólicos que interactúan con especies reactivas de oxígeno, como ocurrió en los tratamientos después de 24 semanas de almacenamiento (Figura 1.B), donde el tratamiento SCS (2.501 ± 0.27 mg EAG / g) presentó el contenido mayor en fenoles totales con diferencia significativa ($p \leq 0.05$) a los demás tratamientos, resultado ligeramente mayor a lo reportado por Valdés-Morales *et al.* (2014) para polvo de cáscara y semilla de tomate saladette y Abouel-Yazeed *et al.* (2019) en polvo de semilla y cáscara de tomate,

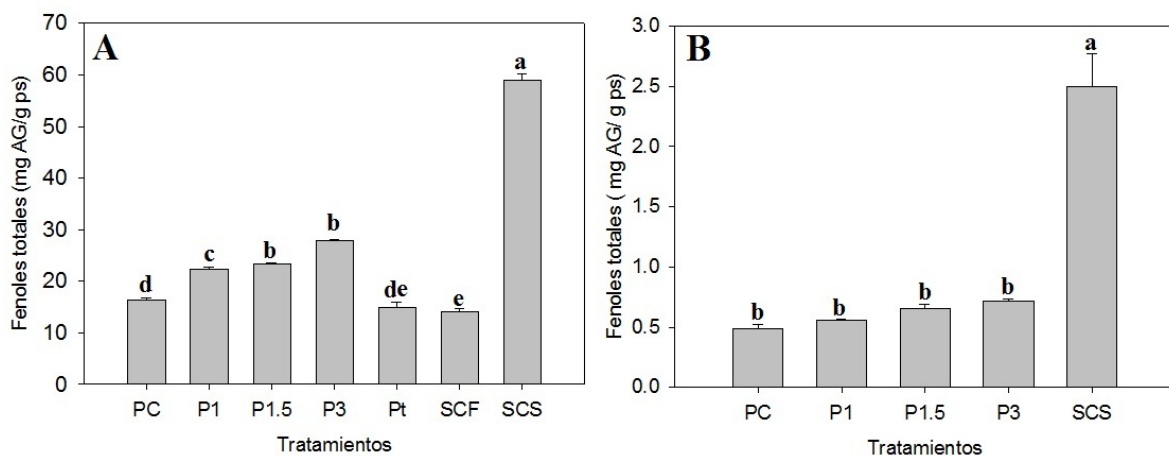


Figura 1. Resultados de Fenoles totales. A: Semana 0 de procesamiento; B: Semana 24 de almacenamiento. Diferente literal (abcde) entre columnas indica diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$). PC= Extracto pasta control; P1= Extracto de pasta adicionado con 1 % de semilla y cáscara en polvo; P1.5= Extracto de pasta adicionado con 1.5 %; P3= Extracto de pasta adicionado con 3 %; Pt= Extracto de pulpa de tomate; SCF= Extracto de semilla y cáscara fresca; SCS= Extracto de semilla y cáscara seca.

Figure 1. Results of total phenols. A: Week 0 of processing; B: Week 24 storage. abcde, different literal means statistically significant difference between treatments (Tukey $p \leq 0.05$). PC = Control paste extract; P1 = Pasta extract added with 1% seed and shell powder; P1.5 = Pasta extract added with 1.5%; P3 = Pasta extract added with 3%; Pt = Tomato pulp extract; SCF = Fresh seed and shell extract; SCS = Seed extract and dried husk.

donde se observó un deterioro de los compuestos fenólicos. A pesar del deterioro a través del tiempo, la tendencia de los resultados permaneció constante, entre los tratamientos referentes a pastas de tomate, el mayor contenido de fenoles fue en P3 sin diferencia significativa ($p > 0.05$) con P1 (0.556 ± 0.02 mg EAG / g) y P1.5 (0.656 ± 0.04 mg EAG / g), sin embargo, sí hubo diferencia con PC (0.488 ± 0.03 mg EAG / g) lo que se atribuyó al contenido fenólico que aportó la adición de la semilla y cáscara de tomate, resultado menor a los mostrado por Vallverdú-Queralt *et al.* (2012), debido principalmente al procesamiento de las muestras por liofilización para la obtención de los extractos diferente al secado convencional.

Se sabe que la capacidad antioxidante total de tomate está dada por la suma de la actividad que aporte cada uno de los componentes bioactivos (carotenos (licopeno y β -caroteno), ácido ascórbico, tocoferol y compuestos fenólicos). Sin embargo, los más resistentes a los procesamientos térmicos son el licopeno y los compuestos fenólicos (Navarro-González *et al.* 2001). Según Valdez- Morales *et al.* (2014), los compuestos fenólicos más abundantes en la cáscara del tomate saladette son el ácido cafeico, ferúlico y vanílico; y, en la semilla son el ácido sinápico, ferúlico y vanílico, los cuales permanecieron activos después del tratamiento térmico.

Otro indicador importante, en la capacidad antioxidante es la inhibición del radical DPPH, que consiste en evaluar el potencial antioxidante de un compuesto, ya que es una técnica rápida, simple y sus resultados son comparables con otros métodos (Kedare y Singh, 2011). Los resultados (figura 2) mostraron mayor inhibición del radical DPPH en SCS (72.012 ± 2.664 %) con diferencia significativa a los demás tratamientos ($p \leq 0.05$), dichos valores son mayores a lo reportado por Sarkar y Kaul (2014) en semilla y cáscara liofilizadas (37.5 ± 1 %) y deshidratadas de forma convencional (34 ± 0.8 %), y a su vez, mayores a los encontrados por Valdés-

Morales *et al.* (2014) en subproductos de tomate liofilizados y a Elbadrawy y Sello (2016) en extractos de cáscara de tomate.

Con respecto a las pastas de tomate, P3 (67.207 ± 0.52 %), que contiene la mayor cantidad de cáscara y semilla deshidratada, no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con P1 (64.228 ± 1.19 %) y P1.5 (66.174 ± 0.461 %), contrario a lo sucedido con PC, a pesar de que el porcentaje añadido varía del 1 al 3 %.

El almacenamiento prolongado en condiciones normales (Figura 2.B), provocó una disminución de la capacidad antioxidante similar a Vallverdú-Queralt *et al.* (2011), quienes evaluaron el porcentaje de inhibición a través del tiempo en productos derivados del tomate almacenados en condiciones controladas a $4^\circ\text{C} \pm 1$ y envases Tetrapak. Lo anterior, se atribuye a que la disminución más significativa de la capacidad antioxidante por almacenamiento ocurre entre 0 y 6 meses de almacenamiento.

TEAC es un método que se basa en la habilidad para inactivar el radical ABTS para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y bebidas, y ORAC es un método que permite medir la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (Zulueta *et al.*, 2009). Los resultados después de 24 semanas de almacenamiento en condiciones normales (Tabla 1), mostraron una tendencia similar a lo encontrado en fenoles y DPPH en la semana 0 de almacenamiento. Los resultados mostraron variación entre cantidades en función del método y el radical utilizado, a pesar de que son diferentes mecanismos de inactivación (reacción de transferencia de átomos de hidrógeno y métodos basados en la transferencia de electrones), estos presentan el mismo comportamiento (Karadag *et al.*, 2009).

El valor más elevado de TEAC lo presentó SCS con diferencias significativa ($p \leq 0.05$) con los demás tratamientos. Con respecto a las pastas de tomate, PC no presentó dife-

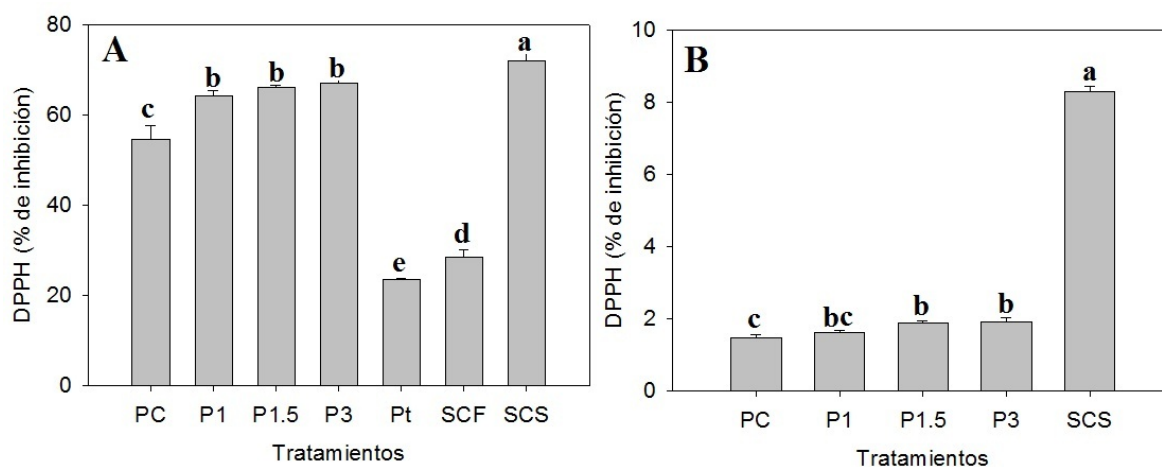


Figura 2. Inhibición del radical DPPH. A: Semana 0 de procesamiento; B: Semana 24 de almacenamiento. Diferente literal (abcde) entre columnas indica diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$). PC= Extracto pasta control; P1= Extracto de pasta adicionado con 1 % de semilla y cáscara en polvo; P1.5= Extracto de pasta adicionado con 1.5 %; P3= Extracto de pasta adicionado con 3 %; Pt= Extracto de pulpa de tomate; SCF= Extracto de semilla y cáscara fresca; SCS= Extracto de semilla y cáscara seca.

Figure 2. DPPH radical inhibition. A: Week 0 of processing; B: Week 24 storage. Different literal (abcde) means statistically significant difference between treatments (Tukey $p \leq 0.05$). PC = Control tomato paste extract; P1 = Tomato paste extract added with 1% seed and shell powder; P1.5 = Tomato paste extract added with 1.5%; P3 = Tomato paste extract added with 3%; Pt = Tomato pulp extract; SCF = Fresh seed and shell extract; SCS = Seed extract and dried husk.

Tabla 1. Capacidad antioxidante mediante TEAC y ORAC en 24 semanas de almacenamiento.

Table 1. Antioxidant capacity through TEAC and ORAC in 24 weeks of storage.

TRATAMIENTOS	TEAC (µM ET/g ps)	ORAC (µM ET/g ps)
PC	2.547±0.04d	12.032±0.14c
P1	2.821±0.02d	13.908±0.42bc
P1.5	4.145±0.02c	17.881±1.31bc
P3	7.241±0.03b	21.526±3.45b
SCS	14.722±0.50a	53.693±0.41a

Diferente literal (abcde) dentro de cada columna indica diferencia significativa (Tukey $p \leq 0.05$). PC= Extracto pasta control; P1= Extracto de pasta adicionado con 1 % de semilla y cáscara en polvo; P1.5= Extracto de pasta adicionado con 1.5 %; P3= Extracto de pasta adicionado con 3 %; SCS= Extracto de semilla y cáscara seca.

Different literal (abcd) means statistically significant difference between treatments (Tukey $p \leq 0.05$). PC = Control tomato paste extract; P1 = Tomato paste extract added with 1% seed and shell powder; P1.5 = Tomato paste extract added with 1.5%; P3 = Tomato paste extract added with 3%; Pt = Tomato pulp extract; SCF = Fresh seed and shell extract; SCS = Seed extract and dried husk.

rencia significativa ($p > 0.05$) con P1, sin embargo, sí hubo diferencia ($p \leq 0.05$) con P1.5 y P3. En las pastas de tomate, P3 presentó el valor de TEAC mayor ($7.241 \pm 0.03 \mu\text{M TE} / \text{g}$) y el comportamiento mostró que el aumento en el contenido de semilla y cáscara de tomate aumentó el valor de TEAC. Los resultados obtenidos en PC y P1 son ligeramente menores a lo reportado por Katirci *et al.* (2018) en pasta de tomate comercial ($6.16 \mu\text{M TE} / \text{g}$), pero mayor a pasta de tomate casera ($2.67 \mu\text{M TE} / \text{g}$); También Capanoglu *et al.* (2008) comparó la capacidad antioxidante mediante ABTS de la pasta de tomate en cada etapa del proceso de elaboración y obtuvo $39.88 \pm 3.85 \mu\text{M TE} / \text{g}$ y Thomas *et al.* (2017) obtuvieron $5.764 \pm 3.85 \mu\text{M TE} / \text{g}$. Lo anterior se atribuyó a las condiciones de almacenamiento y tiempo de exposición a la iluminación. Resultados similares fueron reportados por Pokorný *et al.* (2004), donde la pasteurización y el almacenamiento causaron pardeamiento acompañado de un aumento en la intensidad del color de los vegetales como resultado de la oxidación de los compuestos fenólicos a sus respectivas quinonas. Además, señalaron que, en la composición del tomate, en comparación con otros antioxidantes, incluidos otros carotenoides, el licopeno es relativamente estable, pero se puede perder como resultado de la degradación térmica y la oxidación, se degrada fácilmente por exposición al aire, esto puede ser evidente por una pérdida de enrojecimiento en los productos.

La capacidad antioxidante de los tratamientos utilizando la metodología ORAC fue mayor a la utilizada por TEAC, con una tendencia similar, debido a que ORAC permite analizar la capacidad antioxidante de alimentos o bebidas de una naturaleza más compleja (Zulueta *et al.* (2009). El tratamiento SCS ($53.693 \pm 0.41 \mu\text{M ET} / \text{g}$) resultó menor a lo reportado por Perea-Dominguez *et al.* (2018) realizado a subproductos de tomate, que se liofilizaron para conservar

la muestra, lo que provocó una mayor conservación de los compuestos antioxidantes.

Adicionalmente, se establecieron coeficientes de correlación de Pearson entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante. En la tabla 2 se puede observar una correlación lineal positiva fuerte entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante con valor de R superior a 0.9. Lo cual indica que, a mayor concentración de compuestos fenólicos, la capacidad antioxidante del alimento es más elevada. Se ha reportado que no todos los compuestos que se extraen, pertenecen al grupo fenólico, y que además pueden tener la capacidad de actuar contra un radical libre en una metodología para determinar la actividad antioxidante (Sagdic *et al.*, 2011). Estos resultados concuerdan con los reportados por Valdez-Morales *et al.* (2014) quienes reportan correlaciones fuertes con un valor de R superior a 0.8 entre compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Tabla 2. Coeficientes de correlación de Pearson entre el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante.

Table 2. Pearson's correlation coefficients between phenolic compound content and antioxidant capacity.

	Fenoles	DPPH	ORAC	TEAC
Fenoles	1			
DPPH	0.990	1		
ORAC	0.984	0.966	1	
TEAC	0.963	0.949	0.974	1

CONCLUSIONES

A partir de los resultados, se concluyó que la cáscara y semilla deshidratada del tomate son ricas en compuestos fenólicos con alta actividad antioxidante, y estos se unen principalmente a los componentes estructurales de las paredes celulares. Cuando se determina la actividad antioxidante de un alimento se buscan técnicas que se complementen, por lo que se prefiere evaluar varios métodos en lugar de un enfoque unidimensional, ya que algunas técnicas como ORAC utiliza radicales libres de importancia biológica y se basa en la transferencia de átomos de hidrógeno, mientras que DPPH y TEAC se basan en la transferencia de electrones en radicales sintéticos. La valorización de la semilla y cáscara obtenida de un proceso industrial del tomate, podría generar ingresos adicionales para la industria del tomate y reducir el problema de eliminación de desechos. Los resultados de este estudio brindan a los productores de tomate y empresarios información que permite denotar que, agregar semilla y cáscara de tomate a una pasta, mejora el contenido de fenoles y antioxidantes del alimento, sin embargo, el procesamiento tradicional y secado convencional utilizado en los tratamientos provocó disminución de la cantidad de fenoles totales y capacidad antioxidante con respecto a lo reportado en muestras liofilizadas. Es por lo anterior que la industria alimenticia debe decidir sobre el costo-beneficio del producto que desean obtener. El almacenamiento en condiciones normales provocó una disminución de los anti-

oxidantes presentes, por lo que es indispensable adecuar el almacenamiento en condiciones controladas que permitan una mejor conservación de los antioxidantes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a Tecnológico Nacional de México, especialmente al Instituto Tecnológico Superior de Guasave por el recurso económico y por brindar las instalaciones para el desarrollo del proyecto. Gracias al Clúster Hortaliceros Unidos de Sinaloa por su colaboración en la investigación.

REFERENCIAS

- Abouel-Yazeed, A. M., Abou-Tor, E. S. y Boriy, E. G. 2019. Utilization of husk tomato fruit seeds powder in some foodstuff. *J. Food and Dairy Sci.*, Mansoura Univ., Vol. 10(8): 281- 288.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT- J. Food Sci. Technol.* 28: 25-30.
- Büyükbay, E. O., Sayili, M., y Uzunoç, M. 2009. The relationship between socio-economic characteristics and sauce consumption of consumers: case of Tokat province. *Electronic Journal of Food Technologies*, 4(1), 1-7.
- Capanoglu, E., Beekwilder, J., Boyacioglu, D., Hall, R., y de Vos, R. 2008. Changes in Antioxidant and Metabolite Profiles during Production of Tomato Paste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 964–973. doi:10.1021/jf072990e
- Dorais, M., Ehret, D. L., y Papadopoulos, A. P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. *Phytochemistry Reviews*, 7(2): 231–250. doi:10.1007/s11101-007-9085-x
- Elbadrawy, E., y Sello, A. 2016. Evaluation of nutritional value and antioxidant activity of tomato peel extracts. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1010-S1018. doi:10.1016/j.arabjc.2011.11.011
- Karadag, A., Ozcelik, B., y Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food analytical methods*, 2(1): 41-60.
- Katirci, N., Işik, N., Güpür, Ç., Ozge Guler, H., Gursoy, O., y Yilmaz, Y. 2018. Differences in antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of commercial and homemade tomato pastes. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. doi:10.1016/j.jssas.2018.11.003
- Kedare, S. B., y Singh, R. P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4): 412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
- Navarro-González, I., García-Valverde, V., García-Alonso, J., y Periago, M. J. (2011). Chemical profile, functional and antioxidant properties of tomato peel fiber. *Food Research International*, 44(5): 1528–1535. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.005
- Pellegrini N., Re, R., Min, Y., y Rice-Evans, C. 1999. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2, 2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods Enzymol.* 299: 379-389.
- Perea-Domínguez, X. P., Hernández-Gastelum, L. Z., Olivás-Olguin, H. R., Espinosa-Alonso, L. G., Valdez-Morales, M., y Medina-Godoy, S. 2018. Phenolic composition of tomato varieties and an industrial tomato by-product: free, conjugated and bound phenolics and antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, 55(9): 3453-3461. doi:10.1007/s13197-018-3269-9.
- Pokorný, J., Schmidt, Š., y Nguyen, H. T. T. 2004. Functionality changes of natural antioxidants during food processing and storage. *Czech Journal of Food Sciences*, 22: 80-83.
- Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., y Yilmaz, M. T. 2011. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food Chemistry*, 126(4): 1749-1758.
- Sarkar, A., y Kaul, P. 2014. Evaluation of Tomato Processing By-Products: A Comparative Study in a Pilot Scale Setup. *Journal of Food Process Engineering*, 37(3): 299–307. doi:10.1111/jfpe.12086
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257077/Potencial-Jitomate.pdf>
- Shivashankara K. S, S. Isobe, M. I. Al-Haq, M. Takenaka, y T. Shiina. 2004. Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pretreatment. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1281-1286.
- Singleton V. L. y J. A. Rossi Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 16: 144-158.
- Valdez-Morales, M., Espinosa-Alonso, L. G., Espinoza-Torres, L. C., Delgado-Vargas, F., y Medina-Godoy, S. 2014. Phenolic Content and Antioxidant and Antimutagenic Activities in Tomato Peel, Seeds, and Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(23): 5281–5289. doi:10.1021/jf5012374
- Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., Andres-Lacueva, C., Waterhouse, A. L., y Lamuela-Raventos, R. M. 2012. Effect of tomato industrial processing on phenolic profile and hydrophilic antioxidant capacity. *LWT - Food Science and Technology*, 47(1): 154–160. doi:10.1016/j.lwt.2011.12.020.
- Vinha, A. F., Alves, R. C., Barreira, S. V., Castro, A., Costa, A. S., y Oliveira, M. B. P. 2014. Effect of peel and seed removal on the nutritional value and antioxidant activity of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruits. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1): 197-202.
- Zhang, J., Chu, P. C., Chao, C. y Chen, J. 2011. Effect of three cooking methods on nutrient components and antioxidant capacities of bamboo shoot. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed y Biotechnol)*
- Zulueta, A., Esteve, M. J., y Frígola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1): 310-316.

Papermaking as Potential Use of Fibers from Mexican *Opuntia ficus-indica* Waste

Elaboración de papel como uso potencial de fibras a partir de desechos de *Opuntia ficus-indica*

Citlali Colín-Chávez^{a*}, Herlinda Soto-Valdez^b, José Turrado-Saucedo^c, Armida Rodríguez-Félix^b, Elizabeth Peralta^b, Alma Rosa Saucedo-Corona^c, Marcela Guzmán-Corona^d

^a CONACYT- Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. -CIDAM Kilómetro 8 s/n, Antigua carretera a Pátzcuaro, C.P. 58341. Morelia, Michoacán, México.

^b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. CTAOV. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46. Col. La Victoria, C.P. 83304, Hermosillo, Sonora, México.

^c Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería, Universidad de Guadalajara. Kilómetro 15.5, Carretera Guadalajara-Nogales, Las Agujas, C.P. 45010, Zapopan, Jalisco, México.

^d Instituto Tecnológico José Mario Molina Pasquel y Henríquez. Libramiento Chapala-Ajijic, No 200, C.P. 45900. Chapala, Jalisco, México.

ABSTRACT

The papermaking potential of *Opuntia ficus-indica* (OFI) waste fibers was studied in this research. Alpha cellulose, lignin, hollocellulose, ethanol/benzene extractives and ash content were determined as 53.7±0.1%, 2.4±0.3%, 61.6±5.7%, 7.1±0.3% and 26.4±0.1%, respectively. The average fiber length, width, lumen, and cell wall thickness were found to be 1.1±0.3 mm, 18.8±6.1µm, 12.1±5.4 µm, and 4.3±1.0 µm. Soda pulping was conducted using 20 and 28% sodium hydroxide, cooking temperatures of 160 and 175 °C, cooking times of 60 and 120 min, and liquor- to fiber ratio of 9:1. Soda pulping with 28% sodium hydroxide, 175 °C and 120 min showed a lower Kappa number of 29.60±1.7 and a total yield of 32.2±1.6%. In general, tensile strength index (36.0±5.0 Nm/g), stretch (1.7±0.3%), breaking length (3.7±0.5 km), burst index (3.2±0.4 KPa.m²/g), tear index (7.3±0.0 mN.m²/g), folding endurance (166 times) and porosity (> 120 s) of OFI pulp were comparable with wood and non-wood pulps.

Keywords: *Opuntia ficus-indica* waste, Fiber morphology, Pulp properties, Paper properties, Non-wood paper.

RESUMEN

En esta investigación se estudió el potencial del uso de desechos de fibras de *Opuntia ficus-indica* (OFI) para elaborar papel. La estrategia metodológica que se siguió fue: caracterización de materia prima, análisis morfológico de las fibras, pulpeo soda mediante un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2³, refinación de pulpa, formación y caracterización de hojas. El contenido de alfa-celulosa, lignina, holocelulosa, extractivos en etanol/benceno y cenizas fue de 53.7±0.1%, 2.4±0.3%, 61.6±5.7%, 7.1±0.3% y 26.4±0.1%, respectivamente. El promedio de la longitud de las fibras, ancho, lumen y espesor de la pared celular fue 1.1±0.3 mm, 18.8±6.1µm, 12.1±5.4 µm, 4.3±1.0 µm. Las condiciones de pulpeo fueron: 20 y 28% de hidróxido de sodio, 160 y 175 °C, durante 60 y 120 min y una relación licor/fibra de 9:1. El

proceso de pulpeo con 28% de hidróxido de sodio, 175°C y 120 min mostró un menor número de Kappa (29.60±1.7) y un rendimiento total de 32.2±1.6%. En general el índice de tensión (36.0±5.0 Nm/g), deformación (1.7±0.3%), longitud de ruptura (3.7±0.5 km), índice de estallido (3.2±0.4 KPa. m²/g), índice de rasgado (7.3±0.0 mN.m²/g), resistencia al doblez (166 veces) y porosidad (> 120 s) de la pulpa obtenida fueron comparables con valores reportados para pulpa de fibras maderables y no maderables.

Palabras clave: Desecho de *Opuntia ficus-indica*, Morfología de las fibras, Propiedades de la pulpa, Propiedades de papel, Papel de fibras no maderables.

INTRODUCCIÓN

Nowadays, there is a trend to substitute single-use plastic packaging for environmental-friendly packaging due to the growing awareness of the environmental damages associated (Herbes *et al.*, 2018). Paper and paperboard are tagged as environmental-friendly packaging and can substitute several kinds of plastic.

In 2016, the world production of paper and paperboard was 409 million tons (FAO, 2016). The paper industry is also associated with environmental problems because of its high energy consumption and emissions, high consumption of chemicals and it is a sector with highly intensive use of natural resources, like wood, non-wood fibers, and water (Wang *et al.*, 2016; IEA, 2017; Man *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). The environmental problems related to raw materials for the paper industry require search and study of diverse alternatives that mitigate their effects. The principal natural resource used to produce paper is pulp fibers, which can be obtained from wastepaper pulp, wood pulp and pulp from other fibers. The use of wood to produce paper has caused a great deforestation problem. As a result, in recent years, several research groups have investigated the technical viability of using pulp derived from agro-industry waste, straw, bagasse and other non-wood fibers (Rainey and Covey, 2016;

*Autor para correspondencia: Citlali Colín Chávez
Correo electrónico: citlali.colin@ciad.mx

Recibido: 18 de junio de 2020

Aceptado: 7 de septiembre de 2020

Gonzalo et al., 2017; Kaur et al., 2017). Commercially, pulps derived from straw, bagasse, bamboo, esparto, reeds, grass, flax and hemp are used for paper production (FAO, 2017). The viability for the use of non-wood fibers as a raw material for papermaking will depend on the chemical and morphological properties of the fibers, as well as the availability of this resource, its proximity to the paper factories and, as it has recently been emphasized, the amount of water used during the crop irrigation process (Man et al., 2018). Therefore, it is necessary to continue exploring the use of other non-wood fibers as a raw material for papermaking.

In Mexico, arid and semi-arid lands constitute 49.20% of the national territory. Mexico is also considered one of the main diversity centers of cacti. In fact, there are 586 species of cacti and the highest number of native species in Mexico (Ortega-Baes et al., 2010). The cacti of greatest economic importance in the world are the *Opuntia* spp., commonly named "nopales" in Mexico (Inglese et al., 2018). The economic importance of nopales resides in its nutritional value, functional and therapeutic properties, and its potential use in the cosmetics and bioenergy industries (Ciriminna et al., 2019). The worldwide-cultivated species of *Opuntia* genus is *Opuntia ficus-indica* (OFI). *Opuntia* spp. are characterized by growing in extreme temperature conditions (-10 to 70 °C) and scarce water availability (50 mm or less annual precipitation) (Nobel and Bobich, 2002; Ginestra et al., 2009; Inglese et al., 2018). They also need 20 to 30 days to develop a harvestable size and they have very low lignin content (3.6 to 16%) (Rodríguez-Felix and Cantwell, 1988; Malainine et al., 2003). Mexico has a great availability of wild (83) and cultivated (4) species of OFI (Guzmán et al., 2003). The cultivated area of nopales in Mexico is around 77,878 ha (SIAP 2017). Actually, there is a big interest to valorize nopales, for example, it has been used as biofuel feedstocks and coagulant in wastewater bioremediation (Vishali and Karthikeyan, 2015; Yang et al., 2015; Barbera and Gurnari, 2018). The production of nopales for foodstuff uses generates wastes at agricultural and industrial levels, for example, in Mexico City, each year dethorning process of nopal generates around 40,000 tons of waste (Marin-Bustamante et al., 2017). This can become a focus of contamination (insects and microorganisms). Recently, several publications reveal the possible applications of nopales in science and materials engineering. About this, three research topics were identified: I) Activated charcoal production from OFI (Ouhammou et al., 2017), II) OFI as polymer matrix reinforcement (Malainine et al., 2004; Malainine et al., 2005; Greco et al., 2013; Greco and Maffezzoli, 2015) and III) OFI as raw material for papermaking (Mannai et al., 2016; Mannai et al., 2018). The last topic will be explored in this study. It is important to mention that during the construction of the theoretical framework of this research, only two papers about this topic were found. Tunisian OFI fibers have high cellulose (53%) and low lignin (4.8%) content with long and thick fibers. The Tunisian fibers have chemical and morphological characteristics favorable for papermaking. OFI pulp was obtained by two methods, soda-hydrogen

peroxide (80.8% of yield) and soda-anthraquinone (41.1% of yield) process. The paper sheets obtained, by both methods, had acceptable physical properties. In agreement with this data, OFI fibers can be used as raw material for papermaking (Mannai et al., 2016; Mannai et al., 2018). However, it is necessary to continue exploring the properties of OFI fibers from other regions and other processes.

The aim of the present work was to explore an alternative for processing Mexican *Opuntia ficus-indica* waste to produce paper as a strategy for further valorization. Chemical characterization of the raw material was conducted and the morphological analysis of the fibers. Optimal parameters of the paper preparation procedure based on the soda process were established. Finally, laboratory paper sheets were manufactured and subjected to mechanical testing.

MATERIALS AND METHODS

Raw material

OFI waste cladodes were obtained from a commercial cultivation area in La Victoria, Hermosillo, Sonora (México). OFI waste cladodes did not have quality for food consumption or processing. The cladodes were two years old and 89.23% moisture content. The cladodes size was 41.8 ± 7.5 cm in length, 14.7 ± 2.7 cm in width, and 797.0 ± 287.8 g in weight.

Preparation of raw material

Cladodes were shredded to reduce the particle size and be ready to be ground by a hammer mill (own design) equipped with two different screen sizes (10.82 and 3.16 mm). The ground material was fully washed with water, and sundried to constant moisture. Finally, fibers bundles were manually selected and stored at 20 °C.

Characterization of the raw material

Chemical properties of cladodes were determined in accordance with TAPPI standards for different components such as moisture (TAPPI 412 om-02), lignin (TAPPI 222 om-15), α -cellulose (TAPPI 203 cm-09), water-soluble (TAPPI 207 om-08), 1% NaOH soluble (TAPPI 212 om-18), extractives (TAPPI 204 om-17), and ashes (TAPPI 211 om-16). Holocellulose was quantified according to Mannai et al. (2018).

Morphological studies

The fibers morphology was characterized according to TAPPI 259 om-16. Previously, fibers were treated with 28% NaOH at 176-199 °C for 1 h under constant stirring to remove the cellular content. Characteristics of fibers, including length (L), diameter (D), wall thickness (W), and lumen width (l) were measured with an optical microscope (DMR Leica, Wetzlar, HE, Germany). Additionally, the Runkel ratio (2W/l), flexibility coefficient (l/D), slenderness coefficient (L/D), and stiffness coefficient (2W/D) were obtained (Ogbonnaya et al., 1997; Ververis et al., 2004).

Pulping

Fibers were cooked with NaOH in a 1 L laboratory scale, oil heated, and cylindrical batch reactor (own design).

The cylindrical reactor containing fibers, was introduced in the oil bath when the temperature was 80 °C. The time to reach cooking temperatures was 1 hour after which, it was kept constant. Cooking conditions were as stated in Table 1. The cooked material was filtered (325 mesh) and washed to remove the wastewater.

Table 1. Cooking conditions for *OFI* waste fibers pulping.

Tabla 1. Condiciones de cocción para la pulpa de fibras de desecho de *OFI*.

Parameter	Low value	High value
<i>OFI</i> fiber weight, g	34.10±0.23	
Liquid/solid ratio	9/1	
Active alkali (NaOH), %	20	28
Temperature, °C	160	175
Time, min	60	120

Pulp beating

The pulp was beaten in a Jokro-Muhle refiner (P.J & Söhne GmbH, Düren, NW, Germany) at 150 rpm for 25 min. Next, the pulp was screened using a 0.15 mm aperture size sieve (Lorentzen and Wettre, Kista, STO, Sweden) to remove the uncooked material and to evaluate the screened and rejected yield. Additionally, total yield was calculated by adding accepted and rejected yields according to TAPPI 274 sp-13. Kappa number of the pulp was determined according to TAPPI 236 om-13.

Paper sheets formation and characterization

OFI waste paper sheets were prepared with a sheet former used according to TAPPI 205 sp-18. The tensile index according to TAPPI 494 om-13, burst index in accordance to TAPPI 403 om-16, tear index consistent to TAPPI 414 om-12, breaking length and stretch in accordance to TAPPI 494 om-13, folding consistent to TAPPI 423 om-16 and porosity according to TAPPI 460 om16 were determined.

Statistical analysis

For cooking conditions optimization, a completely randomized design with a 2³ factorial arrangement was used. The factors were temperature (160 and 175 °C), reaction time (60 and 120 min), and active alkali (20 and 28%), while the response variables were screening yield, rejects, total yield, and Kappa number. For paper sheet characterization, descriptive statistics and simple linear regression analyses were used.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the raw material

Figure 1 shows the chemical composition of *OFI* waste. The content of lignin in *OFI* waste is 2.4±0.3%, much lower than values reported for any wood and non-wood material used for papermaking. In general, non-wood plants have less lignin than woods. Our results exhibit that lignin content was in the range (2.51-4.80%) reported for *OFI* cladodes (Malainine *et al.*, 2003; Mannai *et al.*, 2016; Cheikh Rouhou *et al.*, 2018). In addition, our results showed that *OFI* waste cladodes has only 8.30, 18.0, and 10.04% of lignin, that other

authors reported for chili paper residue, rice straw, sugarcane bagasse, respectively (Gonzalo *et al.*, 2017; Mulyantara *et al.*, 2017; Kaur *et al.*, 2018). The low lignin content is convenient since one of the principal targets in the pulping process is the elimination of lignin from the fibers. *OFI* waste had a holocellulose content of 61.6%, value also close to that reported for *OFI* trunks (64.5%) and rice straw (60.7%), but lower than that reported for chili paper residue (88.0%) and sugarcane bagasse (76.7%) (Rodríguez *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2008; Mannai *et al.*, 2016; Gonzalo *et al.*, 2017). The *OFI* waste cellulose content was 53.7±1.0%, very similar to that reported for *OFI* trunks (53.6%) and miscanthus residue (51.0%), higher than the reported for rice straw (41.2%), and lower than that reported for sugarcane bagasse (44.9%) (Zhao *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2010; Gonzalo *et al.*, 2017; Mannai *et al.*, 2018). Our results contrast with the 21.60% published by Malainine *et al.* (2003) and the 26.70% published by Cheikh Rouhou *et al.* (2018) for *OFI* cladodes. This apparent lack of agreement can be attributed to the season and age of the plants and edaphic factors at the cultivation sites. The ethanol-benzene extractables content in the *OFI* waste cladodes was 7.10±0.3%. This value is very close to that reported for *OFI* trunks (9.8%) but higher than the published data for sugarcane bagasse (3.2%), and chili paper residue (2.2%) (Zhao *et al.*, 2008; Mannai *et al.*, 2016; Gonzalo *et al.*, 2017; Cheikh Rouhou *et al.*, 2018). In agreement with this result, some *OFI* waste cladodes components will precipitate upon pulping and leave stains in the resulting paper sheets (Rodríguez *et al.*, 2008). Cladodes contain different compounds that can be considered extractables. These compounds include chlorophyll, flavonoids like kaempferol, quercetin, methyl-3-kaempferol, kaempferol 3-methyl ether, quercetin 3-methyl ether, narcissin, (+)-dihydrokaempferol, (+)-dihydroquercetin and eriodictyol; terpenoids like (6S, 9S)-3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside and corchoionoside C; carotenoids like cryptoxanthin, β -carotene and lutein (Jaramillo-Flores *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Stintzing and Carle,

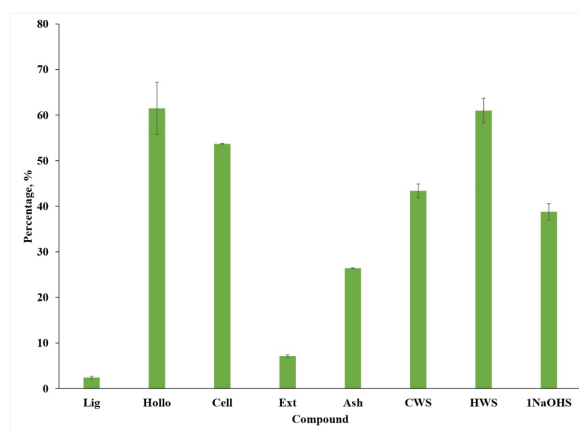


Fig. 1 Chemical characterization of *Opuntia ficus-indica*. Lig: lignin; Hollo: holocellulose; Cell: α -cellulose; Ext: extractives; CWS: cold-water solubles; HWS: hot water solubles; 1NaOHS: 1% NaOH solubles.

Fig. 1. Caracterización química de *Opuntia ficus-indica*. Lig: lignina; Hollo: holocelulosa; Célula: α -celulosa; Ext: extractivos; CWS: solubles en agua fría; HWS: solubles en agua caliente; 1NaOHS: solubles en NaOH al 1%.

2005). Additionally, some pyrones (opuntioside I, opuntioside II, opuntioside III, 4-eyhoxyl-6-hydroxymethyl-apyrone, 7-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranoside) and fatty acids have been extracted from other *Opuntias* (Qiu et al., 2002; Qiu et al., 2007).

The cladodes ashes content was $26.4 \pm 0.1\%$, close to the 23.31% reported for Cheikh Rouhou et al. (2018) a little higher than 19.60% reported by Malainine et al. (2003) and higher than the 5.50% reported by Mannai et al. (2018) for *OFI*. This result can be attributed to the presence of different minerals such as calcium, potassium, iron, and magnesium, being the most abundant calcium oxalate, which is water-insoluble (Stintzing and Carle, 2005; Rodríguez-García et al., 2007). In fact, it is higher than the value reported for wood and non-wood materials used for papermaking. The content of substances soluble in hot water in *OFI* waste cladodes was $61.0 \pm 2.7\%$, higher than the reported for the same species of genus *Opuntia* (25%-cladodes and 36.3%-trunks), eucalyptus, sugarcane bagasse, cotton stalks, and rice straw (Jiménez et al., 2007; Rodríguez et al., 2008; Mannai et al., 2016; Mannai et al., 2018). This property indicates that different components of cladodes such as inorganic compounds, tannins, gums, sugars, and starches will be drawn with hot water. Finally, 1% NaOH solution extracted low molecular weight carbohydrates of *OFI* waste cladodes. The content of substances soluble in 1% NaOH was 38.8 ± 1.80 . This value is higher than the 29.6% reported for *OFI* trunks (Mannai 2016). Zhong et al. (2010) and Majdoub et al. (2001) reported arabinose, galactose, galacturonic acid, glucose, glucuronic acid, xylose, rhamnose, uronic acid like low molecular weight carbohydrates in *OFI* cladodes.

In sum, the chemical properties of *OFI* waste cladodes showed the suitability of this raw material as a non-wood source for papermaking.

Morphological studies

Figure 2 shows an *OFI* waste fiber and Table 2 its morphological characteristics. The size for these fibers was: length 1.1 ± 0.3 mm, diameter 18.80 ± 6.1 μ m, wall thickness 4.30 ± 1.0 μ m, and lumen width 12.10 ± 5.4 μ m. In general, the *OFI* waste fibers are longer than the data published for other *Opuntia* species. Gibson (1977) reported that the size for *Opuntia* species falls in the range of 629 to 330 μ m in length, 38.3 to 16.20 μ m in diameter, and 5.50 to 2.60 μ m in wall thickness. The length of the *OFI* waste fibers is higher than the reported for *OFI* cladodes fibers (0.74 μ m) and *OFI* trunks fibers (0.76 μ m) (Mannai et al., 2016; Mannai et al., 2018). Fiber length of *OFI* waste is in the range of hardwoods (0.7-1.5 mm) and within the range (1.0-2.5 mm) of non-wood fibers such as sugarcane bagasse, rapeseed straw, kenaf and sunflower stalk. The length of *OFI* waste fibers was similar to that of rapeseed straw, sunflower stalk and eucalyptus, but smaller than sugarcane bagasse, kenaf and pine fibers (Ashori et al., 2006; Khristova et al., 2006; Mazhari Mousavi et al., 2013; Gominho et al., 2014; Gulsoy and Ozturk, 2015; Rudi et al., 2016). Fibers with low (<1) Runkel ratio are assessed to be efficient for sheet formation by the combination effect of



Figure 2. *Opuntia ficus-indica* fibers.

Figura 2. Fibras de *Opuntia ficus-indica*.

Table 2. Morphological characteristics of *OFI* waste fibers.

Tabla 2. Características morfológicas de las fibras de desecho de *OFI*.

Parameter	Value
Fiber length, mm	1.1 ± 0.3
Fiber diameter, μ m	18.8 ± 6.1
Fiber lumen width, μ m	12.1 ± 5.4
Fiber wall thickness, μ m	4.3 ± 1.0
Elasticity coefficient	0.60 ± 0.11
Slenderness coefficient	60.9 ± 17.8
Runkel ratio	0.80 ± 0.44

OFI results are presented as mean \pm SD of seven replicates.

thin walls and wide lumen. On the other hand, fibers with high Runkel ratio (>1) are considered not to be efficient for sheet formation because these are indicative of tubular and noncollapsible fibers, providing a low bonding area (Villar et al., 2009). In agreement with the obtained Runkel ratio for *OFI* waste fibers (0.80 ± 0.44), these are suitable as raw material for papermaking.

According to the flexibility ratio, there are four groups of fibers (San et al., 2016): I) High elastic fibers with an elasticity ratio >75, II) Elastic fibers with an elasticity ratio between 55-75, III) Rigid fibers with an elasticity ratio between 30-50, and IV) Highly rigid fibers with an elasticity ratio <30. The flexibility ratio of *OFI* fibers was found to be 0.60 ± 0.11 ; therefore, these are elastic fibers. The flexibility ratio shows the degree of fiber bonding in paper sheet (Anupam et al., 2016). Because *OFI* fibers have efficient elasticity, they are suitable for paper production. The slenderness ratio shows the fibers ability to bond with each other. If fibers have a high slenderness ratio, then these can collapse easily resulting in good surface contact and inter-fiber bonding during the formation of paper. The recommendable slenderness ratio for fibers to papermaking is > 30. Along with the slenderness ratio (60.9 ± 17.8), *OFI* waste fibers are suitable to make paper.

In summary, anatomical ratios of *OFI* waste fibers show the suitability of these as a non-wood source for papermaking.

Pulp analysis

Figure 3 presents the general process of *OFI* waste fibers pulping, and Table 3 shows the cooking conditions and pulp properties obtained from *OFI* waste fibers. The screening yields were in the range of 14.0 to 41.8% and time and % NaOH showed statistically significant differences ($p \leq 0.05$) on this property. This variable was inversely proportional to reaction time. Surprisingly, even when *OFI* waste cladodes contain low levels of lignin, the pulp yield was directly proportional to % NaOH. This behavior should be more attributed to the composition of the lignin itself than to its concentration. The exact proportion of syringyl, guaiacyl and p-hydroxyphenyl units of lignin in *OFI* fibers has not been reported. However, considering our results, we can hypothesize that the guaiacyl units are in a greater proportion in the lignin of *OFI* waste fibers because these structures are more difficult to hydrolyze during the alkaline pulping. Guaiacyl units have one methoxyl group and a free carbon-5 available for carbon-carbon inter-unit bonds, which make them resistant to lignin depolymerization in pulping. In contrast,

syringyl units are relatively unbranched and have a lower degree of condensation and therefore are easier to delignify (Del Río *et al.*, 2007).

From all the pulping conditions, treatments 2 and 6 applied the lowest level of time and the highest level of % NaOH giving screening yields of 41.8 and 36.3%, respectively. However, the pulps delignification degree obtained with these treatments was not enough. Rejects values ranged between 0.1 and 29.5%. According to this variable, the samples were grouped in two categories. In the first, the rejects were up to 21.0% and the pulps obtained with the treatments 1, 3, 4, 5 and 7 classified in this category. In the second category, the rejects were lower than 0.2% and the pulps obtained with the treatments 2, 6 and 8 classified here. Pulps obtained from treatments 2 and 6 showed the highest pulping yield but did not have an adequate delignification. The total yield for *OFI* waste pulp was in the range of 32.2 to 45.0%. These values are in the range of yields reported for non-wood species such as rice straw, *Leucaena*, and morning glory (Dutt *et al.*, 2004; López *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008).



Figure 3. General process of *Opuntia ficus-indica* pulping. a) Raw material; b) Hammer mill c) Dry raw material; d) Fiber bundles; e) Cooking; f) Beating; g) Screening; h) Paper sheets forming; i) Final paper sheet.

Figura 3. Proceso general de desulpado de *Opuntia ficus-indica*. a) Obtención de la materia prima; b) Reducción de materia prima; c) Secado de materia prima; d) Obtención de haces de fibrosos; e) Cocción; f) Refinación; g) Depuración; h) Formación de hojas de papel; i) Hoja de papel.

Table 3. Cooking conditions and properties obtained from *OFI* waste pulp.

Tabla 3. Condiciones de cocción y propiedades de la pulpa obtenida residuos de *OFI*.

Treatment	Temperature, °C	Time, min	NaOH, %	Screening yield, %	Reject, %	Total yield, %	Kappa number
1	160	60	20	24.0±0.9	21.0±4.0 ^b	45.0±4.9	70.0±0.4 ^a
2	160	60	28	41.8±2.8	0.2±0.3 ^a	42.0±2.5	59.6±2.1 ^{ab}
3	160	120	20	19.7±1.3	23.3±2.2 ^b	43.0±0.8	53.0±1.9 ^{bc}
4	160	120	28	20.6±0.4	21.5±1.1 ^b	42.1±1.5	47.1±0.3 ^{bd}
5	175	60	20	18.2±4.6	22.1±3.9 ^b	40.4±0.7	37.3±0.2 ^{de}
6	175	60	28	36.3±7.7	0.1±0.0 ^a	36.4±7.6	38.5±8.8 ^{df}
7	175	120	20	14.0±4.8	29.5±1.5 ^b	43.5±6.3	42.4±1.7 ^{cdg}
8	175	120	28	32.1±1.6	0.2±0.0 ^a	32.2±1.6	29.6±1.7 ^{efg}

Results are presented as mean ± SD of two replicates.

Means within a column followed by different letters differ significantly at $p < 0.05$.

The Kappa number ranged between 29.6 and 70.0 for all the pulp treatments. This number expresses the lignin content in the pulp and how easy it is bleached. Severe pulping conditions favored the Kappa number. The pulp with the highest Kappa number was obtained with 20% NaOH, 60 min and 160 °C (treatment 1). On the other hand, the pulp with the lowest Kappa number was obtained with treatments 5 and 8, which consisted of 20% NaOH for 60 min at 175 °C, and 28% NaOH for 120 min at 175 °C, respectively. Kappa numbers for both treatments were transformed into residual lignin giving 4.8 and 3.8% for treatments 5 and 8, respectively. Both values are in the range (2-5%) suggested for materials suitable for bleaching pulps (García-Hortal et al., 2008). Nevertheless, the lignin residual value for the pulp of treatment 5 was close to the upper limit and the rejects were high. On the other hand, the lignin residual value for the pulp of treatment 8 was at good level and the rejects were low. According to these results, the best conditions for pulping were 28% NaOH for 120 min at 175 °C (treatment 8). In conclusion, *OFI* waste fibers exposed with a soda pulping process (28% NaOH, 175 °C and 120 min) produced pulps with a low Kappa number.

Characterization of paper sheets

Figure 3i exhibits a paper sheet of *OFI* waste pulp and Table 4 shows the paper sheet properties produced with the *OFI* waste pulp. Tensile strength index is a property that is influenced by three factors: fiber length, fiber strength and fiber bonding ability. Generally, softwood pulps have a higher tensile index than hardwood ones, and non-wood pulps have a low tensile strength index in comparison with softwood and hardwood pulp. In agreement with this, tensile strength index for *OFI* waste pulp (36.0±5.0 Nm/g) is low in comparison with that of pine (76.1 Nm/g) and poplar (40.40 Nm/g) pulps. However, it is in the same range of pulp derived from non-wood fibers like sugarcane bagasse (38.2 Nm/g), rice straw (41.7 Nm/g) and sunflower stalks (43.64 Nm/g) (Khristova et al., 2006; Fišerová and Gigac, 2011; Sarwar Jahan et al., 2012; Mazhari Mousavi et al., 2013; Danielewicz et al., 2015).

The burst index is a measure of the resistance to rupture of paper. Several authors suggest that this property is intimately related to the cell wall thickness and length of the fibers (Horn, 1974). The longer the fibers are, the greater the burst index. On the other hand, the greater the cell wall thickness of the fiber, the lower the burst index. *OFI* waste burst index (3.2±0.4 kPam²/g) is higher than the reported by Mannai et al. (2018) for *OFI* papers (5.8 kPam²/g). However, the fibers (0.76 mm) used for Mannai et al (2018) were shorter than the fibers used for us on this research. This difference could be influenced by the conditions of the pulping process. The *OFI* waste burst index is in the range published for wood and non-wood papers sheets like *Agave tequilana* (2.2 kPam²/g), rapeseed straw (3.42 kPam²/g), sunflower stalks (2.89 kPam²/g), kenaf (3.2 kPam²/g), pine (2.6 kPam²/g) and poplar (2.3 kPam²/g) (Khristova et al., 1998; Iñiguez-Covar-

Table 4. Properties of paper sheets obtained from *OFI* waste pulp.

Tabla 4. Propiedades de las hojas de papel obtenidas a partir de pulpa residual de *OFI*.

Property	Value
Tensile index, Nm/g	36.0±5.0
Stretch, %	1.7±0.3
Breaking length, km	3.7±0.5
Burst index, KPa.m ² /g	3.2±0.4
Tear index, mN.m ² /g	7.3±0.0
Folding endurance, times	166
Gurley's porosity, s	> 120

Results are presented as mean ± SD of ten replicates

rubias et al., 2001; Boeva et al., 2007; Villar et al., 2009; Koray Gulsoy, and Eroglu 2011; Mazhari Mousavi et al., 2013). Tear index reflects the work needed to tear paper and it has a relationship with the length of the fibers (Shmulsky and Jones, 2011). *OFI* waste paper sheets presented a tear index lower than the reported for *OFI* cladodes sheets (12 mNm²/g) and *OFI* trunks sheets (19.2 mNm²/g). These differences can be attributed to *OFI* fiber length, *OFI* cladodes fibers were 0.74 mm and *OFI* trunks fibers were 0.76 mm (Mannai et al., 2016; Mannai et al., 2018). *OFI* waste paper sheets tear index was in the range published for paper sheets of wood and non-wood fibers like *Agave tequilana* (6.9 mNm²/g), sugarcane bagasse (6.3 mNm²/g), and poplar (4 mNm²/g) (Iñiguez-Covarrubias et al., 2001; Khristova et al., 2006). This result is consistent with the reported for paper made with a fiber of similar length as that of rapeseed straw (1.03 mm; 4.90 mNm²/g) and sunflower stalks (1.27 mm; 6.0 mNm²/g) (Khristova et al., 1998; Ai and Tschirner, 2010; Mazhari Mousavi et al., 2013). However, Mannai et al. (2018) indicated a higher tear index (12 mNm²/g) for *OFI* cladodes. The breaking length expresses the length of the paper, which would just break under its own weight. It is a measure of the resistance of paper to direct tension under specific conditions of rate of extension (Ghasemian et al., 2012). Higher values are preferred for a good quality paper. The breaking length obtained for *OFI* waste pulps was 3.7±0.5 km. This value is higher than the reported for *OFI* cladodes paper sheets (1.5 km), *OFI* trunks paper sheets (1.9 km), and rice straw paper sheets (2.7 km) but lower than the reported for *Eulaliopsis binata* paper sheets (5.3 km) (Tyagi et al., 2004; Rodríguez et al., 2008; Mannai et al., 2018).

Stretch reflects the capability of paper to conform a desired contour, or to resist nonuniform tensile stress and it is important in all types of papers. The stretch % obtained for *OFI* waste paper sheets was higher (1.7±0.3%) than the value reported for sheets produced with vine shoots pulp (1.49%) and *Cyanara cardunculus* (1.40%) but lower than the published data for sheets produced with rice straw (1.94-2.40 %) and eucalyptus (3.56%) (Gominho et al., 2001; Mutjé et al., 2005; Jiménez et al., 2007; Rodríguez et al., 2008). Oluwadere and Ashimiyu (2007) found that cell wall thickness and fiber length were the main factors which influenced the strength properties like stretch % in paper sheets obtained from *Leu-*

caena leucocephala pulp. In agreement with this finding, the lower stretch % of sheets produced with *OFI* waste pulp compared to that of sheets produced with eucalyptus pulp can be explained as follow. Although the fiber length for *OFI* (1.1 mm) and eucalyptus (0.93 mm) is similar, the wall thickness is thicker for the eucalyptus fibers (6.1 μm) than for *OFI* fibers (4.3 μm) (Gominho *et al.*, 2014). Therefore, the lower stretch % obtained for the *OFI* waste sheets shows its poor flexibility compared to the high flexibility reported for eucalyptus.

Folding endurance is a property that can be used as an indicator of paper durability. This property measures the capacity of paper of keeping its folding line without breaking during repeating folding. Additionally, it reflects the degree to which the paper keeps its physical properties in relation to the frequency of use (Ponce-Jiménez *et al.*, 2002). *OFI* waste sheets presented a holding endurance (166 times) in the range for non-wood pulps. Folding endurance keep a positive correlation with fiber length (Ona *et al.*, 2001). This correlation can be observed in the paper derived from *OFI* waste fibers with similar length, such is the case of switchgrass (folding endurance = 210; 0.78 mm fiber length), alfalfa (folding endurance = 180; 0.78 mm fiber length), *Ipomea carnea* (folding endurance = 128; 0.62 mm fiber length) and *Cannabis sativa* (folding endurance = 223; 1.11 mm fiber length) (Dutt *et al.*, 2004; Ai and Tschirner, 2010).

Finally, regarding the porosity test, *OFI* waste paper sheets were not permeable to air because its pores were closed. This value is opposite to the reported for *OFI* cladodes (68.6 %) and *OFI* trunks (71.2%) paper sheets (Mannai *et al.*, 2016; Mannai *et al.*, 2018). Air resistance is a property governed by internal structure (type and length of fibers, degree of hydration, orientation and compaction of the fibers, as well as the type and amount of fillers and sizing) (T-460-om-16 2016). For example, paper sheet of kenaf (core fiber) had similar behavior than *OFI* waste paper. Kenaf paper had low air permeability, this was attributed to the fact that the fibers were small. The small size of the fibers facilitated the filling of voids in the paper sheets (Villar *et al.*, 2009). Santos *et al.* (2008) reported that pulp fibers with thinner fiber walls (more collapsible), generate paper structures with lower air permeability. In general, the pulp properties of *OFI* waste fibers were comparable to those of wood and non-woods pulp paper like pine, rapeseed straw, sugarcane bagasse and rice straw.

The main components of paper are recycled pulp (40-43%), chemical pulp (35-39%), mechanical pulp (8-11%), mineral fillers (8-11%) and chemical products (2-3%). The pulps come from different sources and origins. The mix of these components to form the structure of the paper allows high degrees of freedom to design a paper that satisfy the end use specifications of the product (Turrado-Saucedo *et al.*, 2008). According with the results of this research, the stretch and tear indexes of virgin *OFI* pulp agree to those specified for paper kraft (1.5%), bond paper (7.0 mNm^2/g), and coating base paper (6.25 to 8.75) (Escoto-García, 2004; Zanuttini *et al.*, 2008). The *OFI* pulp has its own properties which can be

modified by mixing it with pulp from different sources to satisfy paper type specifications.

CONCLUSIONS

The intrinsic properties, chemical characteristics, and fiber morphology of Mexican *OFI* waste reveals that this non-wood plant can be used as a raw material for paper making. Mechanical properties of paper sheets obtained by the soda process reflect the quality of *OFI* fibers and the adequate conditions of processing applied (time, temperature, and active alkali). It remains to be further clarified whether our findings could be applied to the processing of different types of paper.

The use of *OFI* waste as a raw material for papermaking shows an option to utilize this unused byproduct. Therefore, an approach with respect to the technological, economical, and commercial viability needs to be developed to enable the sustainable utilization of *OFI* waste for papermaking to achieve a complete valorization.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- Ai, J. and Tschirner, U. (2010) 'Fiber length and pulping characteristics of switchgrass, alfalfa stems, hybrid poplar and willow biomasses', *Bioresource Technology*, 101(1), 215-221, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.090>.
- Anupam, K., Sharma, A.K., Lal, P.S. and Bist, V. (2016) 'Physicochemical, morphological, and anatomical properties of plant fibers used for pulp and papermaking' in Ramawat, K. and Ahuja, M., eds., *Fiber Plants* Springer, Cham, 235-248.
- Ashori, A., Harun, J., Raverty, W.D. and Yusoff, M.N.M. (2006) 'Chemical and morphological characteristics of Malaysian cultivated kenaf (*Hibiscus cannabinus*) fiber', *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 45(1), 131-134, available: <http://dx.doi.org/10.1080/03602550500373782>.
- Barbera, M. and Gurnari, G. (2018) 'Quality standards for recycled water: *Opuntia ficus-indica* as sorbent material' in Barbera, M. and Gurnari, G., eds., *Wastewater Treatment and Reuse in the Food Industry* Springer, Cham, 29-47.
- Boeva, R., Petkova, E., Georgieva, N., Yotova, L. and Spiridonov, I. (2007) 'Utilization of a chemical-mechanical pulp with improved properties from poplar wood in the composition of packing papers', *Bioresources*, 2(1), 34-40.
- Cheikh Rouhou, M., Abdelmoumen, S., Thomas, S., Attia, H. and Ghorbel, D. (2018) 'Use of green chemistry methods in the extraction of dietary fibers from cactus rackets (*Opuntia ficus indica*): Structural and microstructural studies', *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 901-910, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.090>.
- Ciriminna, R., Chavarria-Hernández, N., Rodríguez-Hernández, A.I. and Pagliaro, M. (2019) 'Toward unfolding the bioeconomy of nopal (*Opuntia* spp.)', *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6), 1417-1427, available: <http://dx.doi.org/10.1002/bbb.2018>.

- Danielewicz, D., Surma-Ślusarska, B., Żurek, G., Martyniak, D., Kmiotek, M. and Dybka, K. (2015) 'Selected grass plants as biomass fuels and raw materials for papermaking, part II. Pulp and paper properties', *Bioresources*, 10(4), 8552-8564.
- Del Río, J.C., Gutiérrez, A., Rodríguez, I.M., Ibarra, D. and Martínez, Á.T. (2007) 'Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR', *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 79(1), 39-46, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jaap.2006.09.003>.
- Dutt, D., Upadhyaya, J., Malik, R. and Tyagi, C. (2004) 'Studies on pulp and paper-making characteristics of some indian non-woody fibrous raw materials: Part 1', *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(January), 48-57.
- Escoto-García, T. (2004) *Evaluación en la calidad en pulpa, papel y cartón*.
- FAO (2016) 'Producción y comercio mundiales de productos forestales en 2016', *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- FAO (2017) 'Pulp and paper capacities, survey 2016-2021', *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Fišerová, M. and Gigac, J. (2011) 'Comparison of hardwood kraft pulp fibre characteristics and tensile strength', *Cellulose Chemistry and Technology*, 45(9), 627.
- García-Hortal, J., Roncero, T. and Vidal, T. (2008) 'Blanqueo de pasta' in Area, M. C., ed., *Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica*, Argentina: Red Iberoamericana de Docencia e Investigación en Celulosa y Papel, 561.
- Ghasemian, A., Ghaffari, M. and Ashori, A. (2012) 'Strength-enhancing effect of cationic starch on mixed recycled and virgin pulps', *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 1269-1274, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.010>.
- Gibson, A.C. (1977) 'Wood anatomy of opuntias with cylindrical to globular stems', *Botanical Gazette*, 138(3), 334-351.
- Ginestra, G., Parker, M.L., Bennett, R.N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Faulds, C.B. and Waldron, K.W. (2009) 'Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10323-10330, available: <http://dx.doi.org/10.1021/jf9022096>.
- Gominho, J., Fernandez, J. and Pereira, H. (2001) '*Cynara cardunculus* L. — a new fibre crop for pulp and paper production', *Industrial Crops and Products*, 13(1), 1-10, available: [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00044-3](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00044-3).
- Gominho, J., Lopes, C., Lourenço, A., Simões, R. and Pereira, H. (2014) 'Eucalyptus globulus stumpwood as a raw material for pulping', *Bioresources*, 9(3), 4038-4049.
- Gonzalo, A., Bimbela, F., Sánchez, J.L., Labidi, J., Marín, F. and Arauzo, J. (2017) 'Evaluation of different agricultural residues as raw materials for pulp and paper production using a semichemical process', *Journal of Cleaner Production*, 156, 184-193, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.04.036>.
- Greco, A., Gennaro, R., Timo, A., Bonfantini, F. and Maffezzoli, A. (2013) 'A comparative study between bio-composites obtained with *Opuntia ficus indica* cladodes and flax fibers', *Journal of Polymers and Environment*, 21(4), 910-916, available: <http://dx.doi.org/10.1007/s10924-013-0595-x>.
- Greco, A. and Maffezzoli, A. (2015) 'Rotational molding of biodegradable composites obtained with PLA reinforced by the wooden backbone of *Opuntia ficus indica* cladodes', *Journal of Applied Polymer Science*, 132(48), available: <http://dx.doi.org/10.1002/app.42447>.
- Gulsoy, S.K. and Ozturk, F. (2015) 'Kraft pulping properties of European black pine cone', *Maderas: Ciencia y Tecnología*, 17(4), 875-882, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000076>.
- Guzmán, U., Arias, S. and Dávila, P. (2003) *Catálogo de cactáceas mexicanas*, Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Herbes, C., Beuthner, C. and Ramme, I. (2018) 'Consumer attitudes towards biobased packaging - A cross-cultural comparative study', *Journal of Cleaner Production*, 194, 203-218, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.106>.
- Horn, R.A. (1974) *Morphology of wood pulp fiber from softwoods and influence on paper strength*, Madison, Wisconsin, USA: United States Department of Agriculture.
- IEA (2017) 'International Energy Outlook 2017', *International Energy Agency*, Report Number: DOE/EIA-0484 (2017).
- Inglese, P., Mondragon Jacobo, C., Nefzaoui, A. and Sáenz, C. (2018) *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*, Roma: La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas.
- Iñiguez-Covarrubias, G., Díaz-Teres, R., Sanjuan-Dueñas, R., Anzaldo-Hernández, J. and Rowell, R.M. (2001) 'Utilization of by-products from the tequila industry. Part 2: potential value of *Agave tequilana* Weber azul leaves', *Bioresource Technology*, 77(2), 101-108, available: [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00167-X](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00167-X).
- Jaramillo-Flores, M.E., González-Cruz, L., Cornejo-Mazón, M., Dorantes-Alvarez, L., Gutiérrez-López, G.F. and Hernández-Sánchez, H. (2003) 'Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia ficus-indica*)', *Food Science and Technology International*, 9(4), 271-278, available: <http://dx.doi.org/10.1177/108201303036093>.
- Jiménez, L., Pérez, A., de la Torre, M.J., Moral, A. and Serrano, L. (2007) 'Characterization of vine shoots, cotton stalks, *Leucaena leucocephala* and *Chamaecytisus proliferus*, and their ethyleneglycol pulps', *Bioresource Technology*, 98(18), 3487-3490, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.11.009>.
- Kaur, D., Bhardwaj, N.K. and Lohchab, R.K. (2017) 'Prospects of rice straw as a raw material for paper making', *Waste Management*, 60, 127-139, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.08.001>.
- Kaur, D., Bhardwaj, N.K. and Lohchab, R.K. (2018) 'A study on pulping of rice straw and impact of incorporation of chlorine dioxide during bleaching on pulp properties and effluents characteristics', *Journal of Cleaner Production*, 170, 174-182, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.111>.
- Khristova, P., Gabir, S., Bentcheva, S. and Dafalla, S. (1998) 'Soda-anthraquinone pulping of sunflower stalks', *Industrial Crops and Products*, 9(1), 9-17, available: [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(98\)00008-9](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0926-6690(98)00008-9).

- Khrystova, P., Kordsachia, O., Patt, R., Karar, I. and Khider, T. (2006) 'Environmentally friendly pulping and bleaching of bagasse', *Industrial Crops and Products*, 23(2), 131-139, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2005.05.002>.
- Koray Gulsoy, S. and Eroglu, H. (2011) 'Biokraft pulping of European black pine with *Ceriporiopsis subvermispoda*', *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65(4), 644-648, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.013>.
- Lee, E.H., Kim, H.J., Song, Y.S., Jin, C., Lee, K.-T., Cho, J. and Lee, Y.S. (2003) 'Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var.saboten', *Archives of Pharmacal Research*, 26(12), 1018-1023, available: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02994752>.
- López, F., García, M.M., Yáñez, R., Tapias, R., Fernández, M. and Díaz, M.J. (2008) 'Leucaena species valoration for biomass and paper production in 1 and 2 year harvest', *Bioresource Technology*, 99(11), 4846-4853, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.048>.
- Majdoub, H., Roudesli, S. and Deratani, A. (2001) 'Polysaccharides from prickly pear peel and nopals of *Opuntia ficus-indica*: extraction, characterization and polyelectrolyte behaviour', *Polymer International*, 50(5), 552-560, available: <http://dx.doi.org/10.1002/pi.665>.
- Malainine, M.E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R. and Vignon, M.R. (2003) 'Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation', *Carbohydrate Polymers*, 51(1), 77-83, available: [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00157-1](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00157-1).
- Malainine, M.E., Mahrouz, M. and Dufresne, A. (2004) 'Lignocellulosic flour from cladodes of *Opuntia ficus-indica* reinforced poly(propylene) composites', *Macromolecular Materials and Engineering*, 289(10), 855-863, available: <http://dx.doi.org/10.1002/mame.200400103>.
- Malainine, M.E., Mahrouz, M. and Dufresne, A. (2005) 'Thermoplastic nanocomposites based on cellulose microfibrils from *Opuntia ficus-indica* parenchyma cell', *Composites Sciences and Technology*, 65(10), 1520-1526, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2005.01.003>.
- Man, Y., Han, Y., Wang, Y., Li, J., Chen, L., Qian, Y. and Hong, M. (2018) 'Woods to goods: Water consumption analysis for papermaking industry in China', *Journal of Cleaner Production*, 195, 1377-1388, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.026>.
- Mannai, F., Ammar, M., Yanez, J.G., Elaloui, E. and Moussaoui, Y. (2016) 'Cellulose fiber from Tunisian Barbary Fig "*Opuntia ficus-indica*" for papermaking', *Cellulose*, 23(3), 2061-2072, available: <http://dx.doi.org/10.1007/s10570-016-0899-9>.
- Mannai, F., Ammar, M., Yanez, J.G., Elaloui, E. and Moussaoui, Y. (2018) 'Alkaline delignification of cactus fibres for pulp and papermaking applications', *Journal of Polymers and Environment*, 26(2), 798-806, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/s10924-017-0968-7>.
- Marin-Bustamante, M.Q., Chanona-Pérez, J.J., Güemes-Vera, N., Cásarez-Santiago, R., PereaFlores, M.J., Arzate-Vázquez, I. and Calderón-Domínguez, G. (2017) 'Production and characterization of cellulose nanoparticles from nopal waste by means of high impact milling', *Procedia Engineering*, 200, 428-433, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proeng.2017.07.060>.
- Mazhari Mousavi, S.M., Hosseini, S.Z., Resalati, H., Mahdavi, S. and Rasooly Garmaroody, E. (2013) 'Papermaking potential of rapeseed straw, a new agricultural-based fiber source', *Journal of Cleaner Production*, 52, 420-424, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.02.016>.
- Mulyantara, L.T., Harsono, H., Maryana, R., Jin, G., Das, A.K. and Ohi, H. (2017) 'Properties of thermomechanical pulps derived from sugarcane bagasse and oil palm empty fruit bunches', *Industrial Crops and Products*, 98, 139-145, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.003>.
- Mutjé, P., Pèlach, M.A., Vilaseca, F., García, J.C. and Jiménez, L. (2005) 'A comparative study of the effect of refining on organosolv pulp from olive trimmings and kraft pulp from eucalyptus wood', *Bioresource Technology*, 96(10), 1125-1129, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.001>.
- Nobel, P.S. and Bobich, E.G. (2002) 'Environmental Biology' in Nobel, P. S., ed., *Cacti Biology and Uses*, United States of America: University of California, 57-74.
- Oluwadare, A.O. and Ashimiyu, O.S. (2007) 'The relationship between fiber characteristics and pulp-sheet properties of *Leucaena leucocephala* (lam.) de Wit', *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2(2), 63-68.
- Ona, T., Sonoda, T., Ito, K., Shibata, M., Tamai, Y., Kojima, Y., Ohshima, J., Yokota, S. and Yoshizawa, N. (2001) 'Investigation of relationships between cell and pulp properties in Eucalyptus by examination of within-tree property variations', *Wood Science and Technology*, 35(3), 229-243, available: <http://dx.doi.org/10.1007/s002260100090>.
- Ortega-Baes, P., Sührling, S., Sajama, J., Sotola, E., Alonso-Pedano, M., Bravo, S. and Godínez-Alvarez, H. (2010) 'Diversity and conservation in the cactus family' in Ramawat, K. G., ed., *Desert plants: biology and biotechnology*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 157-173.
- Ouhammou, M., Lahnine, L., Mghazli, S., Hidar, N., Bouchdoug, M., Jaouad, A., Mandi, L. and Mahrouz, M. (2017) 'Valorisation of cellulosic waste basic cactus to prepare activated carbon', *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jssas.2017.03.003>.
- Ponce-Jiménez, M.D.P., Toral, F.A.L. and Fornue, E.D. (2002) 'Antifungal protection and sizing of paper with chitosan salts and cellulose ethers. Part 1, physical effects', *Journal of the American Institute for Conservation*, 41(3), 243-254.
- Qiu, Y., Chen, Y., Pei, Y., Matsuda, H. and Yoshikawa, M. (2002) 'Constituents with radical scavenging effect from "*Opuntia dillenii* ": structures of new alpha-pyrone and flavonol glycoside', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(11), 1507-1510, available: <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.50.1507>.
- Qiu, Y.K., Zhao, Y.Y., Dou, D.Q., Xu, B.X. and Liu, K. (2007) 'Two new α -pyrones and other components from the cladodes of *Opuntia dillenii*', *Archives of Pharmacal Research*, 30(6), 665-669, available: <http://dx.doi.org/10.1007/BF02977624>.
- Rainey, T.J. and Covey, G. (2016) 'Pulp and paper production from sugarcane bagasse' in O'Hara, I. M. and Mundree, S. G., eds., *Sugarcane-based Biofuels and Bioproducts*, United States of America: John Wiley & Sons, 259-280.
- Rodríguez-Felix, A. and Cantwell, M. (1988) 'Developmental changes in composition and quality of prickly pear cactus cladodes (nopalitos)', *Plant Foods for Human Nutrition*, 38(1), 83-93, available: <http://dx.doi.org/10.1007/BF01092314>.

- Rodríguez, A., Moral, A., Serrano, L., Labidi, J. and Jiménez, L. (2008) 'Rice straw pulp obtained by using various methods', *Bioresource Technology*, 99(8), 2881-2886, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.003>.
- Rodríguez, A., Sánchez, R., Requejo, A. and Ferrer, A. (2010) 'Feasibility of rice straw as a raw material for the production of soda cellulose pulp', *Journal of Cleaner Production*, 18(10), 1084-1091, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2010.03.011>.
- Rodríguez-García, M.E., de Lira, C., Hernández-Becerra, E., Cornejo-Villegas, M.A., Palacios-Fonseca, A.J., Rojas-Molina, I., Reynoso, R., Quintero, L.C., Del-Real, A., Zepeda, T.A. and Muñoz-Torres, C. (2007) 'Physicochemical characterization of nopal pads (*Opuntia ficus indica*) and dry vacuum nopal powders as a function of the maturation', *Plant Foods for Human Nutrition*, 62(3), 107-112, available: <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-007-0049-5>.
- Rudi, H., Resalati, H., Eshkiki, R.B. and Kermanian, H. (2016) 'Sunflower stalk neutral sulfite semi-chemical pulp: an alternative fiber source for production of fluting paper', *Journal of Cleaner Production*, 127, 562-566, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.04.049>.
- San, H.P., Long, L.K., Zhang, C.Z., Hui, T.C., Seng, W.Y., Lin, F.S., Hun, A.T. and Fong, W.K. (2016) 'Anatomical features, fiber morphological, physical and mechanical properties of three years old new hybrid Paulownia: green Paulownia', *Research Journal of Forestry*, 10(1), 30-35, available: <http://dx.doi.org/10.3923/rjf.2016.30.35>.
- Santos, A.J.A., Anjos, O. and Simoes, R. (2008) 'Influence of kraft cooking conditions on the pulp quality of *Eucalyptus globulus*', *Appita Technology, Innovation, Manufacturing, Environment*, 61(2), 148.
- Sarwar Jahan, M., Shamsuzzaman, M., Rahman, M.M., Iqbal Moeiz, S.M. and Ni, Y. (2012) 'Effect of pre-extraction on soda-anthraquinone (AQ) pulping of rice straw', *Industrial Crops and Products*, 37(1), 164-169, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.11.035>.
- Shmulsky, R. and Jones, P.D. (2011) *Forest products and wood science: an introduction*, Pondicherry, India: John Wiley & Sons.
- SIAP (2017) 'Anuario Estadístico de la Producción Agrícola'.
- Stintzing, F.C. and Carle, R. (2005) 'Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses', *Molecular Nutrition Food Research*, 49(2), 175-194, available: <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200400071>.
- Sun, M., Wang, Y. and Shi, L. (2018) 'Environmental performance of straw-based pulp making: a life cycle perspective', *Science of The Total Environment*, 616-617, 753-762, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.250>.
- T-460-om-16 (2016) 'Air resistance of paper (Gurley method)', *TAPPI*.
- Turrado-Saucedo, J., Saucedo-Corona, A., Iñiguez-Covarrubias, G., López-Dellamary, F., Pérez-Ramos, S., Villar-Guaitirrez, J. and Mutjé-Pujol, P. (2008) 'Tecnología en la fabricación de papel' in Area, M., ed., *Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica*, Argentina: Red Iberoamericana de Docencia e Investigación en Celulosa y Papel, 561.
- Tyagi, C.H., Dutt, D. and Pokharel, D. (2004) 'Studies on soda and soda-AQ pulping of *Eulaliopsis binata*', *Indian Journal of Chemical Technology*, 11(1), 127-134, available: <http://dx.doi.org/http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/9494>.
- Villar, J.C., Revilla, E., Gómez, N., Carbajo, J.M. and Simón, J.L. (2009) 'Improving the use of kenaf for kraft pulping by using mixtures of bast and core fibers', *Industrial Crops and Products*, 29(2-3), 301-307, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2008.06.002>.
- Vishali, S. and Karthikeyan, R. (2015) 'Cactus *Opuntia ficus-indica*: an eco-friendly alternative coagulant in the treatment of paint effluent', *Desalination and Water Treatment*, 56(6), 1489-1497, available: <http://dx.doi.org/10.1080/19443994.2014.945487>.
- Wang, Y., Yang, X., Sun, M., Ma, L., Li, X. and Shi, L. (2016) 'Estimating carbon emissions from the pulp and paper industry: a case study', *Applied Energy*, 184, 779-789, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.05.026>.
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, J.A., Cushman, J.C., Tian, E. and Lin, H. (2015) 'Biomass characterization of Agave and *Opuntia* as potential biofuel feedstocks', *Biomass and Bioenergy*, 76, 43-53, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.03.004>.
- Zanuttini, M., Antúnez, C., Clemente, A., Torres, A., Ferreira, P. and Mochiutii, P. (2008) 'Propiedades del papel' in Area, M., ed., *Panorama de la industria de celulosa y papel en Iberoamérica*, Argentina: Red Iberoamericana de Docencia e Investigación en Celulosa y Papel, 561.
- Zhao, X.-B., Wang, L. and Liu, D.-H. (2008) 'Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work', *J Chem Technol Biot*, 83(6), 950-956, available: <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1889>.
- Zhong, X.-K., Jin, X., Lai, F.-Y., Lin, Q.-S. and Jiang, J.-G. (2010) 'Chemical analysis and antioxidant activities in vitro of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. cultivated in China', *Carbohydr Polym*, 82(3), 722-727, available: <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.042>.



Use of hydrolysis prior to the chemical and thermomechanical modification of rice starch: alternative to traditional modification treatments

Uso de hidrólisis previa a la modificación química y termomecánica de almidón de arroz: alternativa a las modificaciones tradicionales

Nancy Paola Grajeda-Nieto¹, Mayra Márquez-Gómez¹, Tomás Galicia-García^{1*}, Iván Alziri Estrada-Moreno², Mónica Elvira Mendoza-Duarte², Rubén Márquez-Meléndez¹, Martha Graciela Ruiz-Gutiérrez¹, Armando Quintero-Ramos¹, Beatriz Portillo-Arroyo¹, Cesar Soto Figueroa¹

¹ Faculty of Chemical Science. University Campus II. Food Science and Technology Programme. Autonomous University of Chihuahua, Chihuahua, Chih. CP. 31125. Mexico.

² Research Center of Advance Materials S.C. CIMAV-Chihuahua. Miguel de Cervantes 120, Complejo Industrial Chihuahua. Chihuahua, Chih. CP. 31136. Mexico.

ABSTRACT

Isolated rice starch (NS), was subjected to chemical and thermomechanical modification with (MHS) and without (MS) previous hydrolysis for the evaluation of the main starch properties such as degree of substitution (DS), color, water absorption and solubility index (WAI, WSI), viscosity, texture, thermal properties (differential scanning calorimetry DSC) and structural properties (infrared-IR, Xray-Rx analysis, and relative crystallinity index-ICR). The DS obtained in both starches was within the range allowed by the FDA for its safety use as food ingredient (0.01-0.2). The modification showed an increase in WAI and WSI values, being WAI value higher in MS (4.80) and WSI value higher in MHS (32.06). The viscosity of retrogradation showed a significant decrease ($P < 0.05$) in MHS (0.013) and MS (5.613), however, the hardness of starch gels decreased (60 %) while the adhesiveness decreased only in MS (66 %). The ICR in MHS and MS increased with regard to the NS. The presence of the acetyl group in the starch molecule was observed in the signals between 1650 to 1744 cm^{-1} confirming the esterification. The starches showed a high potential for its application as edible coatings and as wall material for microencapsulation.

Keywords: Modified starch, Native starch, Acetylation, Extrusion, Hydrolysis.

RESUMEN

Almidón de arroz aislado (AN), fue sometido a modificación química y termomecánica con hidrólisis previa (AMH) y sin hidrólisis previa (AM), para ser caracterizado en grado de sustitución (GS), color, índice de absorción y solubilidad en agua (IAA e ISA), así como sus propiedades reológicas (viscosidad, textura), térmicas (Calorimetría diferencial de barrido - DSC) y estructurales (Infrarrojo- IR, rayos X-Rx e índice de cristalinidad relativa-ICR). El GS obtenido en ambos almidones se encontró dentro del rango permitido por la FDA (0.01-0.2) siendo seguro como ingrediente alimenticio. La modificación mostró un incremento en IAA e ISA, obteniéndose el mayor valor de IAA en el AM (4.80) y de ISA en el AMH (32.06). La viscosidad de retrogradación presentó

una disminución significativa ($P < 0.05$) en AMH (0.013) y AM (5.613), así mismo la dureza de los geles de almidón decreció (60 %) mientras que la adhesividad disminuyó únicamente en AM (66 %). El ICR en AMH y AM aumentó con respecto al AN. La presencia del grupo acetilo en la molécula de almidón se observó en las señales entre 1650-1744 cm^{-1} , confirmando la esterificación. Los almidones evaluados presentan alto potencial para su uso como recubrimientos comestibles y como materiales de pared para microencapsulación.

Palabras clave: Almidón Modificado, Almidón nativo, Acetilación, Extrusión, Hidrólisis.

INTRODUCTION

Rice (*Oryza sativa L.*) is one of the most consumed cereals in the world after corn, wheat and barley. Two-thirds of the world population includes rice in their diet, and their annual demand increase to 480 million tons (USDA, 2015). During rice harvesting and processing, broken grains are obtained, that are not used as raw material for consumption. An added value can be given to those grains by using them as raw material for starch extraction (Colussi *et al.*, 2015; Dias *et al.*, 2010). The main structural component of rice grain is represented by the endosperm (93%), which is constituted by a majority fraction of starch (90%) (Jualiano y Tũaño, 2019). Starch is a polymer formed by glucose units linked by α -D-(1,4) glucosidic bonds for the linear region corresponding to amylose, and α -D-(1,6) for branched region corresponding to amylopectin (Thomas *et al.*, 1999). These two polymers constitute most of the native starch granules and, in lower proportion, also contain lipids and minerals (Copeland *et al.*, 2009).

The food industry has used starch as a raw material due to its high availability, since they are found in diverse vegetable sources such as cereals, tubers, and roots (Singh *et al.*, 2004; Estrada-Girón *et al.*, 2015), but also due to their high functionality when used as thickener and binder in the preparation of foods, including soups, sauces, baby foods, mayonnaise and bakery products (Eliasson, 2004). The high amylose content is suitable for food coatings such as fruit,

*Autor para correspondencia: Tomás Galicia García
 Correo electrónico: tgalicia@uach.mx

Recibido: 25 de mayo de 2020

Aceptado: 21 de septiembre de 2020

potato chips, etc., while the amylopectin content is applied as a thickening, stabilizing and adhesion agent. Likewise, starch has been previously used for the microencapsulation of vanillin extract (Tari *et al.*, 2002), liposoluble vitamins (López-Hernández, 2010) and oleoresins (dos Santos *et al.*, 2005). Also, it is used as a wall material in conjunction with animal proteins and natural gums, which promotes the formation of porous spherical aggregates, allowing a better interaction with other raw materials, thus, achieving a wall material more resistant for the production of food quality microcapsules (Aguilar *et al.*, 2007). However, native starch is not able to cover the range of physical and chemical properties mentioned above in food processing, due to low solubility, instability at different temperatures and retrogradation susceptibility, resulting in syneresis and rigidity (Hagenimana *et al.*, 2006). Therefore, to be used as a food industry ingredient, it is necessary to carry out different structural modifications, which can be of chemical, physical and / or enzymatic type (Amagliani *et al.*, 2016; Bello *et al.*, 2009).

The chemical modification is carried out through the introduction of functional groups in the glucose molecules that make up the starch. This modification decreases the amylose retrogradation and gelation tendency, increases the water retention capacity and hydrophobic properties (Eliasson, 2004; Zavareze *et al.*, 2011). On the other hand, the physical modification consists of the application of physical factors such as pressure, temperature, humidity, and shearing forces, for which an extruder is mainly used (Hagenimana *et al.*, 2006). This type of modification helps to decrease retrogradation since the applied thermomechanical treatment generates a pregelatinization of starch granules which makes it more soluble at room temperature, favoring stability during storage. Alcázar-Alay and Meireles *et al.* (2015) reported the main processes that are carried out in starch, including: a) chemical modification (acid hydrolysis, cationization, acetylation, crosslinking and oxidation), and physical modification (pre-gelatinization, hydrothermal and non-hydrothermal).

The objective of this research is to use an hydrolysis prior to the chemical and thermomechanical modification of rice starch, as an alternative method to traditional modification treatments, reducing the use of reagents, and evaluate the physicochemical, thermal, rheological and structural properties obtained during the modification in order to obtain a starch with functional properties adaptable to the needs of the food industry, especially as an edible coating and active ingredient in encapsulating matrices.

MATERIALS AND METHODS

Raw Material

White rice (Bekers & chefs, Mexico), obtained from the local market (Chihuahua, Mexico), was used as raw material, and NaOH (Macron Fine Chemicals®, USA), HCl (J.T. Baker, USA) and ammonium hydroxide (J. T Baker, USA) were used as reagents.

Obtaining rice flour and isolation of rice starch

Rice grains were subjected to milling (Pulvex® 300, Mexico), the flour obtained was sieved (RoTap® RX-29-E, W.S Tyler, USA) in mesh #35 (500 µm) and the gross fraction was subjected to milling again. The flour was stored in refrigeration (4 °C) until use.

The rice starch isolation was carried out using the methodology reported by dos Santos *et al.* (2005), where to the rice flour a solution of NaOH (0.25 %) was added at a 1:6 (w / v) ratio and kept under constant stirring for 1 h. Subsequently, it was neutralized (pH = 7) with a HCl (10 %) solution and stored in a cold room (5 °C) for 24 hours to complete the sedimentation phase. After this time, the supernatant was removed by decanting and the precipitated starch was centrifuged (Centra CL3R, Thermo IEC, USA) at 4000 rpm (2750 xg) for 10 min. The sedimented starch was dried in an incubator with air circulation (Napco 603, USA) at 40 °C for 12 h. Once dry, the sample was ground (Retsch GmbH, Germany) until obtaining a particle size of 250 µm. The native starch (AN) obtained was stored in refrigeration (4 °C) for subsequent modification, characterization and use.

Modification of starch

In order to evaluate the effect of chemical and thermomechanical treatment on starch, the native starch obtained was separated into two batches; the first one was subjected to a hydrolysis treatment (see next section) prior to modification by esterification and thermomechanical treatment (MHS); while the second batch was subjected to modification by esterification without hydrolysis, and then thermomechanically modified by the extrusion process (MS).

Chemical modification of rice starch

In this work, the starch hydrolysis was only carried out in the first batch according to the methodology suggested by Murúa-Pagola *et al.* (2009), where a suspension (30 % solids) with a HCl solution (3.4%) (JT Baker, USA) was kept under stirring at 50 °C for 6h. Then, the pH was adjusted to 5.5 with a NaOH solution (10 %) and refrigerated (4 °C) for 12 h. Subsequently, the supernatant was decanted, and the precipitated starch was centrifuged (Centra mod CL3R, Thermo IEC, USA) at 4000 rpm (2750 g xg) for 10 min at 20 °C. The obtained starch was dried in an oven with air circulation (Napco 603, USA) for 12 h at 45 °C, and finally grinded to obtain a particle size of 250 µm (Retsch GmbH, Germany). Once the hydrolysis was realized, the starch was subjected to esterification according to the methodology reported by Andreuccetti *et al.* (2012), with acetic anhydride (0.01 % v / p) in a ratio of 11 g of solution / kg of starch (previously adjusted to a humidity of 22 %). The starch was stored for 12 h at 5 °C and the pH adjusted in a range of 8.5 to 9 with a solution of NaOH (10 %) before subjecting it to thermomechanical modification.

Thermomechanical modification of rice starch

Both batches of starch (with and without hydrolysis) were processed in a single screw extruder (Brabender PL

22000, Germany) with a 2:1 compression ratio, at a screw speed of 30 rpm, using a temperature profile of 60, 80 and 100 °C in zones 1, 2 and 3, respectively. The obtained extrudate was dried at 50 °C until a humidity of 11 % to finally be milled (Retsch GmbH, Germany) until obtaining a particle size of 250 µm.

Characterization of the extruded product

The previously acetylated extrudate was characterized by the expansion index and bulk density analysis.

Expansion Index (EI)

EI was determined according to methodology reported by Mendonça *et al.* (2000), where the diameter of the extrudate and the output diameter of the extruder were related to obtain EI. This analysis was performed on 5 extruded products.

Apparent density (AD)

DA was realized according to methodology reported by Pérez-Navarrete *et al.* (2006). The length and diameter of the extruded products were measured. The apparent volume (V) was determined by the relation diameter and height. When the mass and the volume were related, the apparent density (AD) was determined. This analysis was performed on 5 extrudates.

Degree of substitution (DS)

DS was determined by the methodology reported by Bello *et al.* (2010), wherein 1 g of acetylated starch was placed in a 250 mL flask, mixed with 50 mL of ethanol-water solution (75 % v / v), and was stirred for 30 min at 50 °C. Once cold, 40 mL of KOH (0.5N) were added and stored for 72 h, with occasional stirring. Next, each treatment was titrated with a standard solution of HCl (0.5 N), using phenolphthalein as indicator. Simultaneously, a control sample was titrated using native starch. The measurements were made in triplicate and a mean value was reported, with its standard deviation. The percentage of acetylation and the degree of substitution were obtained by means of the following equations:

$$\% \text{Acetylation} = \frac{[\text{mL}(\text{blank}) - \text{mL}(\text{sample})] \times \text{normality of acid} \times 0.043 \times 100}{\text{weight of sample, g (dry basis)}} \quad (\text{Ec. 01})$$

$$DS = \frac{162 \times \% \text{acetylation}}{4300 - (42 \times \% \text{acetylation})} \quad (\text{Ec. 02})$$

Characterization of isolated and modified rice starch

To evaluate the effects of rice starch modification in both batches (with and without hydrolysis) we evaluated the following properties, in comparison to isolated starch (unmodified):

Physicochemical properties

Color

This analysis was carried out using a colorimeter (Konica Minolta® CR-410, Japan), previously calibrated, to determine the values of L* (Luminosity), a* (tendency to green -, or red +) and b* (tendency to blue-, or yellow +) and whiteness index (WI). Five repetitions of each sample were made.

Water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI)

These analyses were realized based on the methodology proposed by Murúa-Pagola *et al.* (2009), where 2.5 g of sample was weighed in 50 mL falcon tubes and 30 mL of distilled water were added. The tubes were kept shaking for 30 min at 30 °C in an incubator (Labnet International, Inc. USA), then the samples were centrifuged at 4000 rpm (2750 xg) for 10 min (Centra CL3R, Thermo IEC, USA). For determination of WAI, the weight of the solid residue was recorded and the ratio of the gain in weight was calculated, expressed as grams of water absorbed per grams of dry sample. For the WSI analysis, the supernatant was decanted in porcelain capsules at constant weight and was evaporated for 24 hours at 110 °C in an oven (Felisa, Mexico) with air circulation. The weight of the capsules with the residue was recorded and related to the original sample as a percentage (%). Both analysis were performed in triplicate.

Viscosity

Viscosity was obtained using a temperature profile. For the temperature scanning, 3 ramps were made with 1 Hz frequency and an oscillating effort of 50.11 Pa. The first ramp was of 25 to 90 °C (10 °C / min), the second ramp was maintained at a temperature of 90 °C for 10 min, and the third ramp of 90 to 25 °C (10 °C / min). With this analysis the maximum viscosity was obtained in the heating cycle (VM), minimum viscosity during the stability cycle (V90), as well as maximum viscosity (Ve) during the cooling cycle. Through the difference of V90 and Ve, the retrogradation viscosity (Vr) was determined. The analysis was performed in duplicate and a mean value was reported, with its standard deviation. This analysis was performed in triplicate.

Texture properties

To evaluate the consistency of the gels containing modified and native starches, we used the methodology reported by Hleap & Velasco (2010) using a TA-XT plus Texture Analyzer (Texture Technologies, USA). Before the analysis, 25 g of sample were gelatinized (AN, AMH, AM) by adding 150 mL of water and maintaining constant agitation for 2 min at 50 °C; then the temperature was increased to 92 °C for 5 min, and finally it was cooled to 50 °C for 1 min. The prepared gel was maintained at a refrigeration temperature of 5 °C / 24 h. The texture analysis was performed using a 30 ° acrylic conical geometry (TA-17^a, stable Micro System, USA), to measure the compression at a 10 mm distance and a speed of 5 mm / s. The test was performed twice at the same point. This analysis was done in duplicate.

Thermal Properties

Differential scanning calorimetry (DSC)

It was carried out according to the methodology reported by Liu *et al.* (2009). To analyze the starch gelatinization temperature, 3 to 4 mg were placed in aluminum capsules of 40 μL adding 20 μL of deionized water and closed hermetically. The capsules were placed in the calorimeter (TA Instrument Q-200, Crawley, UK) previously calibrated with indium and sapphire. They were brought to a temperature range of 20 to 130 $^{\circ}\text{C}$, at a heating rate of 5 $^{\circ}\text{C} / \text{min}$. This analysis was done in duplicate.

Structural Properties

Infrared spectroscopy with Fourier Transforms (FTIR)

The infrared spectra obtained from the native and modified starches were analyzed using an infrared spectrophotometer (Spectrum GX Model FT-IR, Perkin Elmer Brand) equipped with a KBr pill system. For each sample, 16 scans were collected with a resolution of 4 cm^{-1} , interval 1 cm^{-1} and an average value was obtained. The region in which they were analyzed was from 400 to 4000 cm^{-1} , each sample was made in triplicate.

X-ray diffraction (XRD) and relative crystallinity index (ICR)

XRD was realized according to the methodology described by Zazueta-Morales (2003), using an X-ray diffractometer (Rigaku, Ultima D / Max-2100 RigakuDenki Co., Ltd., Japan). The films obtained were ground to a particle size of less than 420 μm (No. 40 mesh). The diffractograms were obtained by scanning at a Bragg angle of 5 $^{\circ}$ to 40 $^{\circ}$ on a 2 θ scale, with 0.02 intervals, operating at 30 kV and 16 mA, using CuK α radiation and a wavelength of 1.5406 \AA . The relative crystallinity index was calculated according to the Heman method with modifications proposed by Rabek (1980), using the following ec (3):

$$ICR = (Ac)/(Aa + Ac) \quad (\text{Ec. 3})$$

Where:

ICR = Relative crystallinity index.

Ac = Crystalline region area.

Aa = Amorphous region area.

Statistical analysis

To determine the statistical differences between the analyzed starches (native and modified), a one-way experiment design was used ($p \leq 0.05$) and for significant statistical differences, the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). Data from the different evaluations were analyzed using Minitab 17 $^{\circ}$ statistical software.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of the extruded product

The apparent density (AD) values of the modified starch were 1.23 g / mL for MHS and 1.26 g / mL for MS. Thymi *et al.* (2005) report that the AD tends to be higher

as the residence time inside of extruder machine increases. This effect causes degradation in the molecular structure of amylopectin of the starch-based material, reduces radial expansion resulting in an increase of the density value. Chinnaswamy & Hanna (1988), report AD values in native maize starches in a range of 0.163 to 0.348 g / mL, difference due to the amylose content present in each treatment, as well as to the thermomechanical process and time of residence to which the starches were subjected in the present study.

For the EI response, the MHS (0.99) and MS (0.91) values (Table 1), indicate no expansion in the extrudate, representing a first indication that the process conditions did not damage the starch (Thymi *et al.*, 2005), corroborated with the null color change in the product obtained by extrusion (Aguilar *et al.*, 2007), degree of substitution (Murua-Pagola *et al.*, 2009) and water absorption index (Mali *et al.*, 2005) previously analyzed. Thymi *et al.* (2005) mention that the expansion index depends on the moisture content, the extrusion temperature, and the residence time of the sample; thus, the expansion index tends to decrease as the moisture content increases, reaching an optimum humidity to obtain an expansion between 15 and 18 % (Thymi *et al.*, 2005). This is because the moisture content changes the starch amylopectin molecular structure, reducing the elasticity and thus decreasing the radial expansion index, and therefore, an increase in temperature would significantly influence the expansion index value (Vainionpää, 1991). However, an expansion of the product was not observed, mainly due to the process conditions (moisture, temperature, and residence time) in the extrusion equipment, where the modification favored the opening of the amylopectin molecule, the interaction with water molecules, and the low pressure at the exit of the extruder die, which resulted in null expansion; hence the importance of conditioning the extruded sample by subsequent drying.

Table 1. Characterization¹ of the extruded rice modified starch (MHS, MS)-based product.

Tabla 1. Caracterización¹ del producto extrudido a base de almidón de arroz modificado (MHS, MS).

Analysis	MHS	MS
Ac % ³	2.14 \pm 0.023 ^{a2}	2.47 \pm 1.466 ^a
DS	0.08 \pm 0.001155 ^b	0.13 \pm 0.000343 ^a
EI	0.99 \pm 0.01 ^a	0.91 \pm 0.02 ^b
AD g/mL	1.23 \pm 0.005 ^a	1.26 \pm 0.01 ^a

¹ Results are mean \pm standard error of the mean (n=3).

² Different letters in rows represent significant differences ($p \leq 0.05$) among means obtained by Tukey test.

³ Ac: Acetylation, DS: degree substitute, EI: expansion index, AD: apparent density.

MS: Modified rice starch, MHS: modified rice starch with previous hydrolysis.

Degree of substitution (DS)

The modified starches obtained in the present study had degree of substitution values of 0.08 for MHS and 0.13

for MS (Table 1). Rendón-Villalobos *et al.* (2010) report that the degree of substitution approved by the FDA for food use is 0.01 to 0.2 to provide better stability, thickening and texture. Both treatments are within the established parameters by the FDA (considered appropriate for human consumption). Phillips (1999) report a degree of substitution value of 1.12 in waxy maize starch using 2.25 g of acetic anhydride / 100 g of starch, while Murua-Pagola *et al.* (2009) reported values of 0.033 using the same concentrations and technique, presenting as a difference the use of the extrusion process, once conditioned with acetic anhydride. These values are related to the ones obtained in MHS, which potentiates its application as wall material in microcapsules development for food use. Vaclavik & Christian (2002) mention that through the extrusion process, the starch pre-gelatinization carried out through the application of heat results in a starch that can be solubilized at room temperature. Likewise, through pre-gelatinization, the phenomenon of retrogradation is reduced which generates syneresis, in which the granular structure is lost, the native crystals are melted and their components (amylose and amylopectin) are partially disordered (Bello Pérez *et al.*, 2006).

Physicochemical properties of rice starch

Color analysis, Water absorption and solubility Indices (WAI, WSI)

Table 2 shows values obtained from the color analysis (L^* , a^* and b^* , Whiteness Index WI), the Water Absorption and Solubility Indices (WAI, WSI) of starch, both native and modified by hydrolysis (MHS) and without hydrolysis (MS).

The NS presented a higher luminosity value (97.52) compared to MHS and MS, indicating for both cases that the raw material does not have wild seeds that could favor a reddish hue. In all cases, the high values obtained are indicative that flour and starch come from polished rice (Von Atzingen *et al.*, 2005). Atzingen *et al.* (2005) reported L^* values of 90.52 to 92.90 in flour obtained from polished rice, which indicates that the differences present in modified starches and native starch are probably due to the starch isolation process. The difference observed in the WI between starches is due to the heterogeneity present in the grains of the raw material. Aguilar-Palazuelos (2007) reported that changes in coloration may be related to degradation when severe temperature conditions occur during storage. This tendency did not occur in isolated starch (native starch NS) as corroborated by the L^* value (Table 1). Martínez-Bustos *et al.* (2012) mention that through the extrusion process a rapid water transference to inside of the polymer molecules is generated, as well as an effect of the joint action of mechanical stress and pressure. However, when these conditions (including temperature) are severe can cause a structural destabilization (dextrinization) that is accompanied by the presence of a yellowish color, low WAI values, viscosity and high WSI rates. This effect did not occur in the modified starches (modified starch with hydrolysis MHS and modified starch without hydrolysis MS), where a slight tendency to yellow was observed. Gulati *et al.* (2016)

mention that the coloration will depend on several factors including moisture and temperature, so that a temperature increase in the extrusion equipment can cause a dextrinization favoring, values with a red tendency. This effect was not observed in modified starch samples (Table 1), which indicate the presence of a treatment with high functionality and application for films elaboration.

Table 2. Physicochemical characterization¹ of native (NS) and modified rice starch (MHS, MS).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica¹ del almidón nativo (NS) y modificado de arroz (MHS, MS)

Analysis	NS	MHS	MS
L^* ³	97.52 ± 0.119 ^{a2}	91.25 ± 1.139 ^b	90.36 ± 0.015 ^b
a^*	-0.45 ± 0.01155 ^b	-0.73 ± 0.03 ^c	0.14 ± 0.00577 ^a
b^*	3.33 ± 0.0058 ^c	6.31 ± 0.04 ^a	5.003 ± 0.0058 ^b
WI	86.15 ± 0.119 ^a	70.13 ± 0.958 ^c	84.13 ± 0.018 ^b
WAI	2.37 ± 0.0265 ^c	3.57 ± 0.4029 ^b	4.80 ± 0.1202 ^a
WSI	1.90 ± 0.115 ^c	32.06 ± 5.808 ^a	11.72 ± 0.167 ^b

¹Results are mean ± standard error of the mean (n=5).

²Different letters in rows represent significant differences ($p \leq 0.05$) among means obtained by Tukey test.

³ L^* : luminosity; a^* : tendency to green -, or red +; b^* : tendency to blue-, or yellow +; WI: whiteness index; WAI: water absorption index, WSI: water solubility index

NS: native rice starch, MS: Modified rice starch, MHS: modified rice starch with previous hydrolysis.

The water absorption and solubility indexes (WAI and WSI, respectively) can be used as an indication of the degree of starch modifications by thermomechanical treatments (Rodríguez *et al.*, 2006). Thus, the higher absorption index, the more water is absorbed by starch causing a lower solubility of sample. The native starch presented a lower capacity of water absorption which is reflected in its physicochemical properties (viscosity). The values obtained from WAI (2.37) and WSI (1.9) in NS are related with values reported by Murúa-Pagola *et al.* (2009) for WAI (3.45). The difference present in WAI is an indicative of the isolation process, since in the commercial process a standardized particle size is used, which gives it a greater degree of absorption. A difference between the native and the modified starch is observed for the WAI due to process conditions in the extrusion equipment, which can generate products with greater solubility (Harper, 1992). On the other hand, the increase in the solubility of the modified starch with previous hydrolysis is associated with the lixiviation of the starch chains through a continuous phase which is related to a partial disorganization of the starch components. The high energy generated by the friction inside the extruder causes the fragmentation in starch granules which involve increasing the WSI value (Martínez-Bustos *et al.*, 2012). This tendency is related to the difference observed between the native starch treatment and modified, being MHS greater due to conditioning prior to the thermomechanical process.

Viscosity of starch

The thermomechanical modification to which the starch was subjected by the extrusion equipment had the purpose of favoring the interaction of the acetyl group with the hydroxyl groups available in the molecule through mechanical stress and thermal treatment. In addition, to avoid the retrogradation of starch to the undergo pregelatinization during the process (Hagenimana *et al.*, 2006). Murúa-Pagola *et al.* (2007) discuss that viscosity analysis is a useful tool in determining the degree of starch granules fragmentation due to the conditions or severity of the treatments used.

As the starch solution is heated under constant oscillating stress, an increase in viscosity begins to be observed as the starch granules begin to swell, obtaining the maximum viscosity peak. Once this point is reached, the low molecular weight polymers (amylose) begin to lixiviate resulting in the collapse of the granules and a decrease in viscosity (Tester *et al.*, 2004). Table 3 shows that the viscosity of NS is greater than that of the modified starches; this difference of decrease is mainly due to chemical modification that the starch was subjected. Since the addition of acetyl groups to the glucose molecule reduces the intermolecular forces of the granule, this decreases the viscosity of the starch (Lawal, 2004). This reduction in viscosity coincides with studies reported by Enríquez *et al.* (2013) where they reported a decrease in viscosity in cassava starch modified with respect to the native. Retrogradation is an important parameter in the food industry because it allows a greater storage stability, and can be used in refrigerated foods, frozen foods, dressings, etc. (Singh *et al.*, 2007). It was observed that for the modified starches there was a significant difference when the maximum viscosity values in the heating cycle (VM) and retrogradation (Vr) decrease with respect to NS, product of the chemical and thermomechanical conditioning used. However, the difference in Vr values between modified starches (0.013 Pa*s MHS and 5.61 Pa*s MS) are due to the structural breakage by the chemical conditioning, which confers low viscosity values as well as a suitable functionality such as ingredient in the formulation of wall materials for microencapsulation.

Table 3. Viscosity analysis¹ in native (NS) and modified rice starch (MHS, MS).

Tabla 3. Análisis de viscosidad¹ en almidón nativo (NS) y modificado de arroz (MHS, MS).

Analysis	NS	MHS	MS
VM (Pa.s) ³	151.93 ± 38.73 ^{a2}	0.03 ± 0 ^b	37.57 ± 7.7 ^b
V90 (Pa.s)	34.163 ± 3.99 ^a	0.023 ± 0 ^c	15.57 ± 7.19 ^b
Ve (Pa.s)	54.313 ± 7.65 ^a	0.037 ± 0.01 ^c	21.183 ± 9.13 ^b
Vr (Pa.s)	20.15 ± 5.032 ^a	0.013 ± 0.008 ^b	5.613 ± 2.243 ^b

¹ Results are mean ± standard error of the mean (n=3).

² Different letters in rows represent significant differences (p≤0.05) among means obtained by Tukey test.

³ VM: Maximum viscosity in heating cycle. V90: maximum viscosity during the stability cycle. Ve: maximum viscosity during cooling cycle. Vr: retrogradation viscosity.

NS: native rice starch, MS: Modified rice starch, MHS: modified rice starch with previous hydrolysis.

Murúa-Pagola (2009) reported a maximum viscosity of 0.05 Pa*s in phosphated waxy maize starch (with previous hydrolysis), so when compared to the MHS treatment, the viscosity is lower due to the modification made, as well as the source of the starch used.

Texture Profile Analysis

The texture properties of starch gels are important parameters to evaluate the performance of a starch in the food system, thus favoring the optimization of industrial processes and the development of new products (Singh *et al.*, 2007). The modifications that were realized in the starches gave them different properties within which a lower tendency to form gels can be observed, obtaining a significant difference between the native starch and the modified starches where in both cases the values of hardness and adhesiveness were decreased (Table 4). This trend favors the use of modified starches as stabilizers in frozen foods, and for encapsulation (Singh *et al.*, 2007).

Table 4. Texture profile analysis (TPA)¹ in native (NS) and modified rice starch (MHS, MS).

Tabla 4. Perfil de análisis de textura (TPA)¹ en almidón nativo (NS) y modificado de arroz (MHS, MS).

Analysis	NS	MHS	MS
Hardness (N)	0.33 ± 0.01134a ²	0.28 ± 0.00163b	0.22 ± 0.01797c
Adhesiveness (kg m ² s ⁻²)	-0.01 ± 0.0006a	-0.01 ± 0.0015a	-6.30 ± 0.3853b
Elasticity	0.87 ± 0.02053a	0.78 ± 0.04188b	0.82 ± 0.01528ab
Cohesiveness	0.69 ± 0.02265a	0.36 ± 0.04668b	0.71 ± 0.02566a

¹ Results are mean ± standard error of the mean (n=2).

² Different letters in rows represent significant differences (p≤0.05) among means obtained by Tukey test.

NS: native rice starch, MS: Modified rice starch, MHS: modified rice starch with previous hydrolysis.

For the gel based in modified starch without hydrolysis, the hardness was reduced with respect to the native starch since a slight depolymerization was favored by acetylation and the thermomechanical effect, which causes a weakening of the gel. The same tendency was observed in the modified starch without hydrolysis in comparison with the native starch, where by means of the modification there was a 35 % reduction in the hardness (Puncha-arnon *et al.*, 2013). The lowest cohesive value (0.362) was observed in the hydrolyzed starch, mainly due to the fact that the swollen granules interrupt the starch gel network, which translates into a low association of the number of active zones in the polymer network (Casas Alencáster and Pardo-García, 2005). Regarding to adhesiveness, no significant differences were observed between NS and MHS, however a significant decrease in adhesiveness in the MS treatment was noted, which is directly related to the viscosity thereof, product of the interaction in the reactive sites of the glucose molecule with water through hydrogen bonds (Sothornvit *et al.*, 2005).

Thermal properties

Table 5 shows the values of onset temperature (T_o), gelatinization (T_p) and final (T_f), as well as the enthalpy (ΔH) of native rice starch, modified with hydrolysis and without hydrolysis. The thermal transition behavior shown by the native starch with a range of 72.1 to 80.12 °C is similar to the values reported by Pancha-arnon & Uttapap (2013) where the range goes from 69.4 to 77.3 °C. The increase in the peak temperature for the modified starches is mainly due to the amorphous region that contains the starch granule since the modification produces a destabilizing effect on the crystalline fusion, therefore the temperature has to be higher to melt the crystalline region (Gunaratne *et al.*, 2002). Gonzalez-Soto *et al.* (2011) mention that the gelatinization temperatures of rice starch particles are indicative of the amount of crystalline regions present within the starch granule, since the gelatinization temperature reflects the energy required for achieve the loss of the crystal structure present in the granules.

Table 5. Differential scanning calorimetry (DSC)¹ in native (NS) and modified rice starch (MHS, MS).

Tabla 5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)¹ de almidón nativo (NS) y modificado de arroz (MHS, MS).

Analysis	NS	MHS	MS
T_o (°C) ³	72.10 ± 0.049 ^{b2}	75.46 ± 0.311 ^a	70.515 ± 0.785 ^b
T_p (°C)	76.41 ± 0.085 ^c	81.94 ± 0.099 ^a	76.765 ± 0.064 ^b
T_f (°C)	80.12 ± 1.534 ^b	88.77 ± 0.184 ^a	84.165 ± 1.039 ^b
Enthalpy(J/g)	4.51 ± 0.2404 ^b	3.83 ± 0.0403 ^c	6.5325 ± 0.1237 ^a

¹Results are mean ± standard error of the mean (n=2).

²Different letters in rows represent significant differences ($p \leq 0.05$) among means obtained by Tukey test.

³ T_o = onset temperature, T_p = gelatinization temperature, T_f = final temperature, ΔH = enthalpy of gelatinization.

NS: native rice starch, MS: Modified rice starch, MHS: modified rice starch with previous hydrolysis.

Enthalpy values were obtained for the native starch of 4.51 (Jg^{-1}) and for the modified starch of 6.53 (Jg^{-1}), presenting a same tendency (decrease in enthalpy values) as reported by Colussi *et al.* (2015), where values were obtained for the native 4.51 (Jg^{-1}) and modified 6.5 (Jg^{-1}) starch. The differences are due to the fact that in the modified treatment a structural disorganization was generated, which it requires more energy at a lower heat of fusion (Sha *et al.*, 2012). Due to the introduction of a functional group, in this case the acetyl, a decrease in the gelatinization temperatures of the modified starch was observed, compared to the modified starch with hydrolysis due to the weakening of the intergranular forces during the extrusion caused a disruption of the structure (Colussi *et al.*, 2015). The enthalpy value of MHS is diminished with respect to other starches, probably because there is a glucose chain fragmentation, product of hydrolysis, so the degree of interaction between the starch chains needs less heat energy to melt (Gunaratne *et al.*, 2002). Likewise, the introduction of acetyl groups to the starch breaks the hydrogen bridges, weakening the granular structure, thus decreasing

the enthalpy of gelatinization (Prieto-Méndez *et al.*, 2010). Low enthalpies of gelatinization reduce energy costs during food processing. In this research, an enthalpy reduction ($3.83 \pm 0.04 Jg^{-1}$) in MHS was observed, however, the gelatinization temperature was higher than the rest of the starches (81.94 ± 0.09 °C) with significant difference, probably due to the hydrophobic groups (acetyl) present in the modified starch, when forming inclusion complexes with the amylose, which causes the gelatinization temperatures to move to higher values as the concentration of these groups increases (Morales-Martínez, 2014).

Structural properties

Infrared spectroscopy with Fourier Transforms (FTIR)

The spectra obtained in NS samples (Figure1) using a sweep of 4000 to 500 cm^{-1} , coincide with that reported by Prieto-Méndez *et al.* (2010) in samples of acetylated barley starch. For the native starch there were bands of characteristic groups of starch molecule related to the OH-group, corresponding to the band at 3270 cm^{-1} and to the stretch of CH related with the band at 2950 cm^{-1} , the bands at 1650 cm^{-1} correspond to the scissors vibration of two OH bonds (Mano *et al.*, 2003), while in starches modified by acetylation there are bands between 898-1250 cm^{-1} , which belong to the stretch of the CO group, the signal shown at 1245 cm^{-1} corresponds to the stretching of the acetyl CO groups. In the 3000-3900 cm^{-1} range, an enlarged band was observed, assigned to the vibrations by stretching or tension of the hydroxyl groups and the vibrations by flexion is shown approximately at 1650 cm^{-1} when introducing acetyl groups to the starch this will cause vibrations by bending due to the steric effect (Rivas-González *et al.*, 2009). The increase in the signal between 1650 and 1744 cm^{-1} is attributed to the stretching of the C=O carbonyl ester group, that indicates acetylation (Xu *et al.*, 2004). Previous work such as that of Prieto-Méndez *et al.* (2010) and Rendón-Villalobos *et al.* (2010), this signal is increased since the degree of substitution was higher, due to the increase in the reactivity of acetic anhydride.

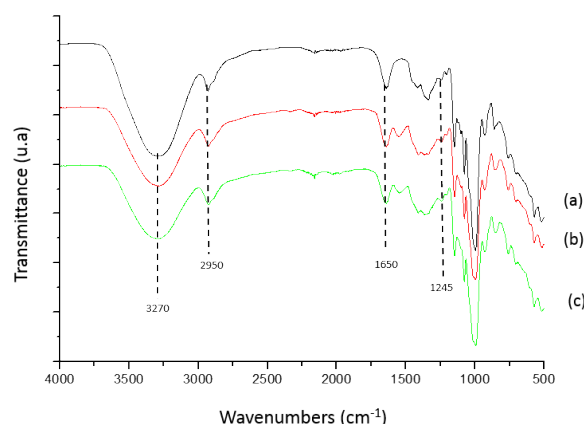


Figure 1. Infrared spectrum (FTIR) of rice starch: a) native (NS), b) modified (MS), and c) modified with previous hydrolysis (MHS).

Figura 1. Espectro infrarrojo (FTIR) de almidón de arroz: a) nativo (NS), b) modificado (MS) y c) modificado con hidrólisis previa (MHS).

Through physical modification the characteristics of rice starch are improved, such as retrogradation and solubilization (Hagenimana *et al.*, 2006; López *et al.*, 2010). Because acetylated starch has a greater capacity to retain water in its matrix, this agrees with the results obtained for solubility, paste consistency and absorption. It is reflected an increase in these results attributed to having a more organized structure (Chel-Guerrero *et al.*, 2012).

X-ray diffraction (XRD) and relative crystallinity index (ICR)

By X-ray diffraction analysis is possible to define the degree of crystallinity of a starch due to crystalline nature, and it is based on the ordered structure of amylopectin molecules inside the granule, this analysis provides information on the modification of starches (Moorthy, 2002; Sebio, 2003).

Figure 2 shows diffractograms corresponding to the native starch in which a pattern type A was observed characteristic in starches, which contain longer amylopectin branched chains corresponding to starches from cereals (Vermeulen, 2004; Thomas *et al.*, 1999) with peaks in values 2θ of 15.14, 17.59, 19.9, 23.14, 26.7 °. These values are similar to those reported by Wang *et al.* (2002) in rice starch where values were 2θ of 15, 17.5, 19, 23, 27.5°. For MHS and MS treatments, peaks were observed at 2θ values of 15.04, 18, 20.05, 23.20 and 15.12, 17.82, 19.95, 22.94 °, with a characteristic type B pattern resulting from the structural modification, which is perceived as a loss of resolution when presenting a greater narrowing and change in intensity.

The relative crystallinity index indicates the degree of crystallinity of a material (Sebio, 2003) which is determined by the relationship between the crystalline area and the total area. The crystallinity index of modified starches MHS (57%) and MS (59%) increased with respect to the native starch NS (40.43%). This is due to the degree of depolymerization, since

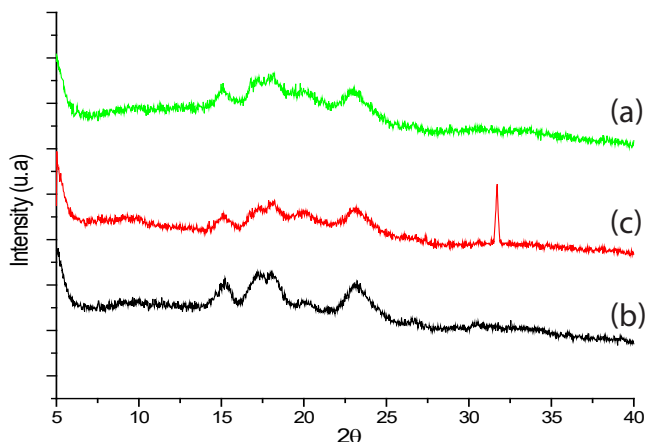


Figure 2. X ray diffraction patterns of rice starch: a) native (NS), b) modified (MS) and c) modified with previous hydrolysis (MHS).

Figura 2. Patrón de difracción de rayos X de almidón de arroz: a) nativo (NS), b) modificado (MS) y modificado con hidrólisis previa (MHS).

the modification did not affect the amorphous part of the granule of starch but the crystalline part (Xie *et al.*, 2005). The same behavior is shown in tapioca starches, where increases in crystallinity are observed when carrying out a modification in the granule structure (Chinachotic *et al.*, 2001). In Figure 3, similar characteristic patterns of cereals are shown where the intensity is decreased in the modified starches.

CONCLUSIONS

An improvement in the physicochemical, thermal and rheological properties of modified rice starch with and without hydrolysis prior to esterification and thermomechanical treatment was obtained, making it suitable for use as functional ingredient in the preparation of edible materials as coating and encapsulating agents. The degree of substitution obtained in modified starch is within the ranges permitted by the FDA, which guarantees its innocuousness for human consumption. The obtained values of apparent density and expansion index in the extruded products are an indicator that the process conditions during the extrusion were controlled without affecting their functional properties of the treatments analyzed, as can be confirmed by not presenting a loss of color, increase of the water absorption index and low values of water solubility index, in comparison with the native starch. Through infrared spectroscopy, differential scanning calorimetry and X-ray diffraction analyses, it was possible to evaluate the presence of greater functionality due to the joint effect of the chemical and thermomechanical modification with respect to native starch. Modified hydrolyzed starch (MHS) treatment due to low viscosity (optimum for the preparation of emulsions), solubility and gelatinization temperature (ideal to be used in a spray drying process) presented a greater functionality to be used as wall material in the microencapsulation of food ingredients. The modified starch without hydrolyzing (MS) treatment presented a high viscosity, cohesiveness and low solubility, characteristics that make it more suitable for films elaboration and edible coatings.

This research shows the importance of the process for starch modification to adapt it to different food matrices, in addition to reiterating the use of rice starch as a natural alternative to commercial ingredients, since its modification by extrusion suggests a more environmentally friendly process to decrease the use of reagents compared to those currently used at industrial level.

ACKNOWLEDGMENT

Two first authors would like to thank to the National Council of Science and Technology (CONACyT) for providing the funding in the Master Science and Food Technology studies at the Chihuahua State University Posgrade Program, included in Excellence Posgrades. The authors want to thanks Erika López for the viscosity measurements and Daniel Lardizabal for the DSC and FTIR measurements.

REFERENCES

- Aguilar-Palazuelos, E., Martínez-Bustos, F., Jiménez-Arévalo, O. A., Galicia-García, T., and Delgado-Rangel, J. A. 2007. Potentiality of some natural fibres and native starch for making biodegradable materials in: Food engineering research developments, (T.P. Klening, ed), pp 279-294. Nova Science Publishers, New York.
- Alcázar-Alay, S.C., and Meireles, A.A. 2015. Physicochemical properties, modifications and applications of starches from different botanical sources. *Food Science and Technology Campinas* 35, 215-236.
- Amagliani, L., O'Regan, J., Kelly, A. L., and O'Mahony, J. A. 2016. Chemistry, structure, functionality and applications of rice starch. *Journal of Cereal Science* 70, 291-300.
- Andreuccetti, C., Carvalho, R. A., Galicia-García, T., Martínez-Bustos, F., González-Núñez, R., and Grosso, C. R. F. 2012. Functional properties of gelatin-based films containing *Yucca schidigera* extract produced via casting, extrusion and blown extrusion processes: A preliminary study. *Journal of Food Engineering* 113, 33-40.
- Bello-Pérez, L. A., Agama-Acevedo, E., Zamudio-Flores, P. B., Mendez-Montealvo, G., & Rodríguez-Ambríz, S. L. 2010. Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT - Food Science and Technology* 43, 1434-1440.
- Bello-Pérez, L. A., and Paredes-López, O. 2009. Starches of some food crops, changes during processing and their nutraceutical potential. *Food Engineering Reviews* 1, 50-65.
- Bello Pérez, L. A., González Soto, R. A., Sánchez Rivero, M. M., Gutiérrez Meraz, F., and Vargas Torres, A. 2006. Extrusión de almidones de fuentes no convencionales para la producción de almidón resistente. *Agrociencia* 40, 441-448.
- Casas-Alencáster, B. N., and Pardo-García, D. G. 2005. Análisis de perfil de textura y propiedades de relajación de geles de mezclas almidón de maíz ceroso entrecruzado-gelana. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 4, 107-121.
- Colussi, R., El Halal, S. L. M., Pinto, V. Z., Bartz, J., Gutkoski, L. C., da Rosa Zavareze, E., and Dias, A. R. G. 2015. Acetylation of rice starch in an aqueous medium for use in food. *LWT - Food Science and Technology* 62, 1076-1082.
- Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., and Tang, M. C. 2009. Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids* 23, 1527-1534.
- Chel-Guerrero, L., Pérez-Flores, V., Betancur-Ancona, D., and Dávila-Ortiz, G. 2012. Functional Properties of Flours and Protein Isolates from *Phaseolus lunatus* and *Canavalia ensiformis* Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 584-591.
- Chinachotic, P., and Varavinita, S. 2001. A study of some physicochemical properties of high-crystalline tapioca starch. *Starch/Stärke* 53, 577-581.
- Chinnaswamy, R., and Hanna, M. A. 1988. Relationship between amylose content and extrusion-expansion properties of com starches. *Cereal Chemistry*, 65, e147.
- Dias, A. B., Müller, C. M. O., Larotonda, F. D. S., and Laurindo, J. B. 2010. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. *Journal of Cereal Science*, 51, 213-219.
- dos Santos, A. B., Fávoro-Trindade, C. S., and Grosso, C. R. F. 2005. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleorresina de páprica obtidas por atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 25, 322-326.
- Eliasson, A.C. 2004. Starch in food: Structure, function and applications: Woodhead Publishing. USA.
- Enríquez C, M., Velasco M, R., and Fernández Q, A. 2013. Caracterización de almidones de Yuca nativos y modificados para la elaboración de empaques biodegradables. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 11, 21-30.
- Estrada-Girón, Y., Martínez-Preciado, A.H., Michel, C.R., and Soltero, J.F.A. 2015. Characterization of Extruded Blends of Corn and Beans (*Phaseolus vulgaris*) Cultivars: Peruano and Black-Querétaro under Different Extrusion Conditions. *International Journal of Food Properties* 18, 2638-2651.
- González-Soto, R. A., de la Vega, B., García-Suarez, F. J., Agama-Acevedo, E., and Bello-Pérez, L. A. 2011. Preparation of spherical aggregates of taro starch granules. *LWT-Food Science and Technology* 44, 2064-2069.
- Gulati, P., Weier, S. A., Santra, D., Subbiah, J., and Rose, D. J. 2016. Effects of feed moisture and extruder screw speed and temperature on physical characteristics and antioxidant activity of extruded proso millet (*Panicum miliaceum*) flour. *International Journal of Food Science & Technology* 51, 114-122.
- Gunaratne, A., and Hoover, R. 2002. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers* 49, 425-437.
- Hagenimana, A., Ding, X., and Fang, T. 2006. Evaluation of rice flour modified by extrusion cooking. *Journal of Cereal Science* 43, 38-46.
- Harper, J. M., Tribelhorn, R. E. 1992. Expansion of native cereal starch extrudates. In: *Food Extrusion Science and Technology*, (J.L. Kokini., C.T. Ho y M.V. Karwe, eds.), pp. 653-667. Marcel Dekker Inc, New York.
- Hleap, J. I., and Velasco, V. A. 2010. Análisis de las propiedades de textura durante el almacenamiento de salchichas elaboradas a partir de tilapia roja (*Oreochromis sp.*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 8, 46-56.
- Juliano, B. O., and Tũaño, A.P. 2019. Gross structure and composition of the rice grain. En: *Rice* (Fourth Edition). Jinsong Bao (ed), pp 31-53. AACC International Press.
- Lawal, O. S. 2004. Composition, physicochemical properties and retrogradation characteristics of native, oxidised, acetylated and acid-thinned new cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) starch. *Food Chemistry* 87, 205-218.
- Liu, H., Xie, F., Yu, L., Chen, L., and Li, L. 2009. Thermal processing of starch-based polymers. *Progress in Polymer Science* 34, 1348-1368.
- López Hernández, O. D. 2010. Microencapsulación de sustancias oleosas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia* 44, 381-389.
- López, O.V., Zaritzky, N.E., and García, M. A. 2010. Physicochemical characterization of chemically modified corn starches related to rheological behavior, retrogradation and film forming capacity. *Journal of Food Engineering* 100, 160-168.
- Mali, S., Sakanaka, L. S., Yamashita, F., and Grossmann, M. V. E. 2005. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers* 60, 283-289.
- Mano, J. F., Koniarova, D., and Reis, R. L. 2003. Thermal properties of thermoplastic starch/synthetic polymer blends with potential biomedical applicability. *Journal of Materials*

- Science: Materials in Medicine 14, 127-135.
- Martínez-Bustos, F., Aguilar-Palazuelos, E., Galicia-García, T., Telis, V. 2012. Thermoplastic Behavior of Biopolymers during Extrusion, *Biopolymer Engineering in Food Processing*. V.R.N. Telis (ed), pp 245-278. CRC Press. USA.
- Mendonça, S., Grossmann, M.V.E., Verhé, R. 2000. Corn Bran as a Fibre Source in Expanded Snacks, *LWT - Food Science and Technology* 33 (1), 2-8.
- Moorthy, S. N. 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches: a review. *Starch-Stärke* 54, 559-592.
- Morales Martínez, L. E. 2014. Morfometría de los granos de arroz (*Oryza sativa* L.) y caracterización fisicoquímica, estructural y reológica de las harinas integrales de las variedades MorelosA-92 y Koshihikari y de seis líneas provenientes de estas. Tesis de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., and Martínez-Bustos, F. 2007. Application of phosphorylated waxy maize starch in the microencapsulation of flavors: characterization and stability. In: *Journal of Food Engineering Research Developments* (T.P. Klening, ed.), Pp. 979-971. Nova Science Publishers, New York.
- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., and Martínez-Bustos, F. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering* 91, 380-386.
- Pérez-Navarrete, C., Cruz-Estrada, R. H., Chel-Guerrero, L. and D, B.-A. 2006. Physical characterization of extruders prepared with corn flour mixtures QPM (*Zea mays* L.) and lima beans (*Phaseolus lunatus* L.). *Mexican Journal of Chemical Engineering* 5, 145-155.
- Phillips, D. L., Liu, H., Pan, D., and Corke, H. 1999. General application of raman spectroscopy for the determination of level of acetylation in modified starches. *Cereal Chemistry* 76, 439-443.
- Prieto-Méndez, J., Trejo-Cárdenas, C. L., Prieto-García, F., Méndez-Marzo, M. A., Bello-Pérez, L. A., and Román-Gutiérrez, A. D. 2010. Acetilación y caracterización del almidón de cebada. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 6, 32-43.
- Puncha-arnon, S., and Uttapap, D. 2013. Rice starch vs. rice flour: Differences in their properties when modified by heat-moisture treatment. *Carbohydrate Polymers* 91, 85-91.
- Rabek, J. F. 1980. Applications of wide-angle X-ray diffraction (WAXD) to the study of the structure of polymers. In: *Experimental methods in polymer chemistry* (H.F. Mark, ed.) pp. 123-140. Wiley-Interscience, New York.
- Rendón-Villalobos, R., García-Hernández, E., Gúizado-Rodríguez, M., Salgado-Delgado, R., and Rangel-Vázquez, N. A. 2010. Obtención y caracterización de almidón de plátano (*Musa paradisiaca* L.) acetilado a diferentes grados de sustitución. *Afinidad*, 67, 548.
- Rivas-González, M., Zamudio-Flores, P. B., and Bello-Pérez, L. A. 2009. Efecto del grado de acetilación en las características morfológicas y fisicoquímicas del almidón de plátano. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 291-297.
- Santos, B. D., Fávoro-Trindade, A., Grosso, C. S. F. and Raimundo, C. 2005. Preparo e Caracterização de Microcápsulas de Oleoresina de Páprica Obtidas por Atomização. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25, 322-326
- Sebio, L. 2003. Desenvolvimento de plástico biodegradável a base de amido de milho e gelatina pelo processo de extrusão: avaliação das propriedades mecânicas, térmicas e de barreira.
- Sha, X. S., Xiang, Z. J., Bin, L., Jing, L., Bin, Z., Jiao, Y. J. & Kun, S. R. 2012. Preparation and physical characteristics of resistant starch (type 4) in acetylated indica rice. *Food Chemistry* 134, 149-154.
- Singh, N., Chawla, D., Singh, J. 2004. Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermal properties of corn and potato starch. *Food Chemistry* 86, 601-608.
- Singh, J., Kaur, L., and McCarthy, J. 2007. Factors influencing the physico-chemical, morphological, thermal and rheological properties of some chemically modified starches for food applications-a review. *Food Hydrocolloids*, 21:1-22.
- Sothornvit, R., and Krochta, J.M. 2005. Plasticizer in edible films and coatings, in *Innovations*. In J.H. Han (ed), *Innovations in foods packings*.403-428. Amsterdam. The Netherlands: Elsevier.
- Tari, T. A., and Singhal, R. S. 2002. Starch-Based Spherical Aggregates: Stability Of A Model Flavouring Compound, Vanillin Entrapped.
- Tester, R. F., Karkalas, J., and Qi, X. 2004. Starch—Composition, Fine structure And Architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2), 151-165.
- Thymi, S., Krokida, M. K., Pappa, A., and Maroulis, Z. B. 2005. Structural Properties of Extruded Corn Starch. *Journal of Food Engineering*, 68(4), 519-526.
- Thomas, T. D. J., and Atwell, W. A. 1999. *Starches*. Eagan Press Handbook.
- Vaclavik, V. A., and Christian, E. W. 2002. *Fundamentos de Ciencia de los Alimentos*: Editorial Acribia, México.
- Vermeylen, R., Goderis, B., Reynaers, H and Delcour, J.A. 2004. Amylopectin Molecular Structure Reflected in Macromolecular Organization of Granular Starch. *Biomacromolecules* 5, 1775-1786.
- Von Atzingen, M. C., and Machado Pinto and Silva, M. E. 2005. Evaluación de la Textura y Color de Almidones y Harinas en preparaciones sin Gluten. *CyTA-Journal of Food* 4, 319-323.
- Wang, Y.J., Wang, L., Shephard, D., Wang, F., and Patindoll, J. 2002. Properties and structures of flours and starches from whole, broken, and yellowed rice kernels in a model study. *Cereal Chemistry* 79, 383.
- Xie, S. X., Liu, Q., and Cui, S. W. 2005. *Starch modification and applications*: CRC Press, USA.
- Xu, Y., Miladinov, V., and Hanna, M. A. 2004. Synthesis and characterization of starch acetates with high substitution 1. *Cereal Chemistry* 81, 735-740.
- Zavareze, E. D. R., and Dias, A. R. G. 2011. Impact of heat-moisture treatment and annealing in starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 317-328.
- Zazueta-Morales, J. J. 2003. Extrusión de maíz (*Zea mays* L.) azul: efecto del hidróxido de calcio sobre las propiedades fisicoquímicas y funcionales. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Querétaro.

Antioxidant and antihypertensive activity of bovine whey protein concentrate enzymatic hydrolysates

Hidrolizados enzimáticos con actividad antioxidante y antihipertensiva obtenidos del concentrado proteico del suero lácteo bovino

Xochitl Tovar-Jiménez^{1*}, Alejandro Téllez-Jurado¹, Carlos Alberto Gómez-Aldapa², Yuridia Mercado-Flores¹ y Ainhoa Arana-Cuenca¹

¹ Universidad Politécnica de Pachuca, Carr. Pachuca-Cd. Sahagún Km. 20, Ex-Hacienda de Santa Bárbara, C.P. 43830 Zempoala, Hidalgo. México.

² Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca - Tulancingo Km. 4.5, Mineral de la Reforma. Hidalgo. C.P. 42184

ABSTRACT

Whey is a polluting by-product of cheese processing. However, it has valuable nutritional properties that can be exploited for diverse applications. Research has shown how whey proteins enzymatic hydrolysis releases bioactive peptides. In the present study, the whey protein concentrate (WCP) hydrolysis was performed using purified *Sporisorium reilianum* aspartyl protease (Eap1), with commercial enzymes chymotrypsin (C) and trypsin (T), as well as different enzymatic combinations in order to determine which enzyme or combination allowed for the release of peptides presenting the highest antioxidant and antihypertensive activity levels. Our results indicated that hydrolysis with Eap1 releases the best-performing peptides (1467.30 mM AAEEA/100g WCP; 835.20 mM FeSO₄/100g WCP and 83.36 % ACE inhibition) in comparison with individual enzymes (Q: 1164.60 mM AAEEA/100g WCP; 305.35 mM FeSO₄/100g WCP; 92.35 % ACE inhibition and T: 354.87 mM AAEEA/100g WCP; 205.82 mM FeSO₄/100g WCP; 83.8 % ACE inhibition) and their combinations (Eap1-C: 1050.23 mM AAEEA/100g WCP; 399.09 mM FeSO₄/100g WCP; 85.58 % ACE inhibition, Eap1-T: 882.5 mM AAEEA/100g WCP; 220.63 mM FeSO₄/100g WCP; 85.40 % ACE inhibition, C-T: 994.67 mM AAEEA/100g WCP; 310.43 mM FeSO₄/100g WCP; 61.27 % ACE inhibition and C-Eap1-T: 93.23 mM AAEEA/100g WCP; 23.3 mM FeSO₄/100g WCP; 38.35 % ACE inhibition).

Keywords: antioxidant peptides; antihypertensive peptides; protein concentrate from bovine whey; aspartyl protease of *Sporisorium reilianum*; commercial enzymes.

RESUMEN

El lactosuero es considerado un subproducto contaminante de la industria quesera, sin embargo, cuenta con importantes propiedades nutrimentales que pueden ser aprovechadas. Estudios indican que la hidrólisis enzimática de sus proteínas permite liberar péptidos bioactivos. En este estudio, se realizó la hidrólisis del concentrado proteico del lactosuero (WCP) por acción de la aspartil proteasa purificada de *Sporisorium reilianum* (Eap1), con las enzimas comerciales

quimotripsina (C), tripsina (T) y de su combinación enzimática, con la finalidad de determinar que enzima permite liberar péptidos con mejor actividad antioxidante y antihipertensiva. Los resultados indicaron que la Eap1 libera péptidos con mejor actividad (1467.30 mM AAEEA/100g WCP; 835.20 mM FeSO₄/100g WCP; 83.36 % inhibición ACE) en comparación con las enzimas individuales (Q: 1164.60 mM AAEEA/100g WCP; 305.35 mM FeSO₄/100g WCP; 92.35 % inhibición ACE y T: 354.87 mM AAEEA/100g WCP; 205.82 mM FeSO₄/100g WCP; 83.8 % inhibición ACE) y sus combinaciones (Eap1-C: 1050.23 mM AAEEA/100g WCP; 399.09 mM FeSO₄/100g WCP; 85.58 % inhibición ACE, Eap1-T: 882.5 mM AAEEA/100g WCP; 220.63 mM FeSO₄/100g WCP; 85.40 % inhibición ACE, C-T: 994.67 mM AAEEA/100g WCP; 310.43 mM FeSO₄/100g WCP; 61.27 % inhibición ACE y C-Eap1-T: 93.23 mM AAEEA/100g WCP; 23.3 mM FeSO₄/100g WCP; 38.35 % inhibición ACE).

Palabras clave: péptidos antioxidantes, péptidos antihipertensivos, concentrado proteico del suero lácteo bovino, aspartil proteasa de *Sporisorium reilianum*, enzimas comerciales.

INTRODUCTION

Whey represents a rich and balanced protein source of amino acids, which allow for a wide range of functional properties. Specifically, whey proteins make up to 20 % of cow milk protein content. Besides their nutritional value (due to their high biological value indexes), in many cases, they also exert biological and physiological effects on the organism (Baró *et al.*, 2001). The presence of leucine, isoleucine, tyrosine, methionine, proline, and valine in the structure of α-Lactalbumin (α-La), β-Lactoglobulin (β-Lg), immunoglobulins (Ig), albumin (BSA), lactoferrin (LF), and lactoperoxidase (LP), has given rise to possible applications for the hydrolysis of these proteins to obtain peptides with different biological properties (Muro-Urista *et al.*, 2011; Tovar-Jiménez *et al.*, 2017). Biological properties are partially attributed to peptides encoded in proteins, which are released after proteolytic digestion (Clare and Swaisgood, 2000; Gobbetti *et al.*, 2002). Whey peptides have multifunctional properties such

*Autor para correspondencia: Xochitl Tovar Jiménez
 Correo electrónico: xtova@upp.edu.mx

Recibido: 7 de junio de 2020

Aceptado: 19 de noviembre de 2020

as antioxidant, antihypertensive, opioid, and immunomodulatory, among others, and these bioactive peptides are used in products such as infant foods, energy drinks, and hypoallergenic foods to offer added value and improve consumer health (Mensink, 2006; Pfeuffer and Schrezenmeir, 2006).

The release of bioactive peptides from whey proteins has been studied over the past decade, but many of the studies have used only digestive enzymes chymotrypsin (C) and trypsin (T) (Lagrange and Clark, 2018; Maa *et al.*, 2018; Kamal *et al.*, 2018; Atacan *et al.*, 2016; Rocha *et al.*, 2011; Bayram *et al.*, 2008). Studies on the hydrolysis of these proteins have not yet been carried out using the enzyme Eap1, produced by the phytopathogen *S. reilianum*, which has 41 kDa molecular weight and it is an aspartyl protease stable at a wide range of temperatures (4 to 45 °C) and pH (3 to 5) values, but 45 °C and pH 3 are optimal points (Mandujano-González *et al.*, 2013) and shows high proteolytic capacity, because it allows us to obtain hydrolysates with antimicrobial activity higher than that generated by C and T, and it was also shown that Eap1 hydrolysates were the only ones that inhibited growth of the yeast *C. albicans* (Tovar-Jiménez *et al.*, 2017). This suggests it could be used like an important biotechnological alternative in the food industry, in the improvement of bio-functional properties or modulating the techno-functional properties of foods due to its high stability at temperature and pH. Since in recent years much of the scientific interest has focused on finding functional foods or ingredients that contribute to the treatment and prevention of degenerative diseases, the rise of bioactive peptides, as a health issue, still remains open, since peptides obtained and their activity depend on the source of the protein and enzymes used.

Likewise, the enzymatic hydrolysis has not been carried out with the combination of Eap1 with enzymes C and T. Thus, the purpose of the present study was to determine whether the action of Eap1-released peptides presents better biological activity than those released by commercial enzymes C and T; in addition, enzymatic cocktails were prepared to determine whether the enzymatic activities of these three enzymes are summative and whether they result in higher levels of antioxidant and antihypertensive activity in the obtained peptides.

MATERIALS AND METHODS

Ten liters of bovine cheese whey from a cheese industry (México country) were used to obtain whey protein concentrate. Samples of 500 mL (511.5 g) of whey were stored at 5 °C before use. Bovine whey proteins were precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, then filtered using nitrocellulose filter paper (Millipore, pore size: 0.45 μm , and dialyzed using a membrane (Thermo Scientific, pore size: kDa). Dialysis was performed until samples reached conductivity $<1 \mu\text{S cm}^{-1}$ (Tovar-Jiménez *et al.*, 2012).

Microorganism

The *S. reilianum* strain was donated by Dr. Santos Gerardo Leyva, of the Universidad Autónoma Chapingo (Mé-

xico). It was grown by periodic cultures in YPD-Agar medium (yeast extract 1%, bacto™ peptone 2%, glucose 2%, and agar 1.5%), incubated at 28 °C for 3 days.

Enzymatic hydrolysis

Purification of the Eap1 enzyme, was performed as indicated by Mandujano-González *et al.* (2013), using anion exchange chromatography with a Bio-Scale Mini UNO sphere Q Cartridge column, coupled to an FPLC system (Bio-Rad). A lineal NaCl gradient was applied (J. T. Baker®), 1 M in Tris (Sigma®), 20 mM at pH 8, and the eluted fraction was taken at a NaCl concentration (J. T. Baker®) between 0.45 and 0.55 mol/L, and commercial enzymes of animal origin, trypsin (T) from bovine pancreas (Sigma®) and chymotrypsin (C) from bovine pancreas (Sigma®) were used to perform hydrolysis at the enzymatic activity levels of 1.37, 3.13, and 3.7 mUA/mL; hydrolysis was also carried out using four enzyme combinations (Eap1-C, Eap1-T, CT, and C-Eap1-T) at an enzymatic activity level of 1.37 mUA/mL.

Hydrolysis kinetics was carried out from 0 to 120 min at 37 °C and optimum pH for each individual enzymes and pH 6. The substrate was adjusted to a concentration of 179.4 μg WCP protein. The non-hydrolyzed proteins were precipitated with 500 μL of 10% trichloroacetic acid. The reaction mixture was centrifuged at g for 5 min. Finally, the supernatant was used to quantify the peptides released after hydrolysis following the micro-Lowry method as reported by Figueroa-Hernández *et al.* (2012). Calculation of the peptides released was done on the basis of curve pattern of tyrosine at a concentration of 0-23 $\mu\text{g/mL}$. All determinations were performed in sextuplicate with the following controls: WCP+TCA+Enzyme, WCP+Sterile distilled water+Enzyme, and Sterile distilled water+TCA+Enzyme. Finally, the biological activity of the hydrolysis product was determined.

Determination of biological activity of released peptides

The antioxidant and antihypertensive activities of the peptides released after the enzymatic hydrolysis were analyzed.

Determination of antioxidant activity

A solution of 7 μM ABTS (AMRESCO ultra-pure grade) was mixed with 4.9 μM ammonium persulfate (Sigma Aldrich brand) at a 1:1 ratio. The radical ABTS^+ was formed after 16 h. ABTS solution was diluted until reaching absorbance between 0.7 and 754 nm, which was achieved by mixing approximately 40 μL of the ABTS^+ solution with 960 μL of absolute ethanol (v/v). Twenty μL of the sample (released peptides) were added to 980 μL of the dilution, and the change in absorbance was measured 7 min after the reaction. The percentage inhibition of ABTS^+ radical was calculated using the pattern curve prepared with ascorbic acid [2mM] (MP Biomedicals), in concentrations from 0 to 0.8 mM. Data are reported as mM of antioxidant activity equivalent to ascorbic acid per 100 g WCP (mM AAEEA/100 g WCP) (Tovar-Jiménez *et al.*, 2012; Mendoza-Jiménez *et al.*, 2018).

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay

The FRAP assay was performed according to the method described by Luo *et al.* (2012). In the assay kit with FRAP method, stock solutions include detective buffer, 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) solution, and TPTZ solution. The working solution was prepared before use by mixing TPTZ dilution, detective buffer, and TPTZ solution at a ratio of 10:1:1 (v/v/v), respectively, then the working solution was incubated at 37 °C. Fourteen μL of hydrolyzed sample (0.1 mg peptides/mL in PBS) were added to the TPTZ solution (504 μL) in a eppendorf tube. After incubation for 30 min at 25 °C, the absorbance of the reaction mixture was measured at 593 nm with a spectrophotometer. The ferric reducing activity was calculated using the FeSO_4 solution (200 mM–1200 mM) calibration curve and was converted to the Fe^{2+} antioxidant capacity value, which was expressed as FeSO_4 mM/100 g WCP.

Determination of antihypertensive activity

The present study used a method described by Nakamura *et al.* (1995). Eighty μL of water or 80 μL of the sample adjusted to a pH of 8.3, were added to 200 μL of the substrate solution, consisting of Hipuryl-Histidyl-Leucine at a concentration of 5 mM, dissolved in 0.1 M sodium borate buffer and 0.3 M NaCl, at pH 8.3. Mixtures were pre-incubated at 37 °C. Twenty μL of ACE (0.1 U/mL, Sigma-Aldrich) were added to initiate the reaction, and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and then decreasing pH with 250 μL of 1 M HCl to inactivate the enzyme. The hippuric acid formed in

the reaction was extracted by vigorous stirring for 10 s after adding 1 mL of ethyl acetate. It was then centrifuged at 4000 g for 10 min at 25 °C, and 500 μL of the organic phase were withdrawn. Ethyl acetate was removed by heating at 95 °C for 10 min. The hippuric acid residue was re-dissolved in 1 mL distilled water, and after shaking, the absorbance at 228 nm was measured by the spectrophotometer. A reaction target was prepared by adding HCl prior to the addition of ACE and Captopril was used as the positive control in this study. The activity of each sample was determined in triplicate, and the results were expressed as percentages of ACE inhibition.

Statistical analysis

For data analysis, the multifactorial analysis of variance methodology was used to determine the individual and joint effects of the factors (enzymatic activity, hydrolysis time and enzyme) on the responses variables (antioxidant and antihypertensive peptides released). Later, the LSD contrast test (minimum significant difference) was performed at a 95% confidence level. The Statistica 7.0 for Windows statistical program was used. Graphs are expressed in means \pm LSD interval.

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of WCP hydrolysis with Eap1, C and T enzymes

Peptides released during hydrolysis of whey proteins depends on the proteolytic activity and time (Figure 1); that is, larger quantities of these compounds are released with

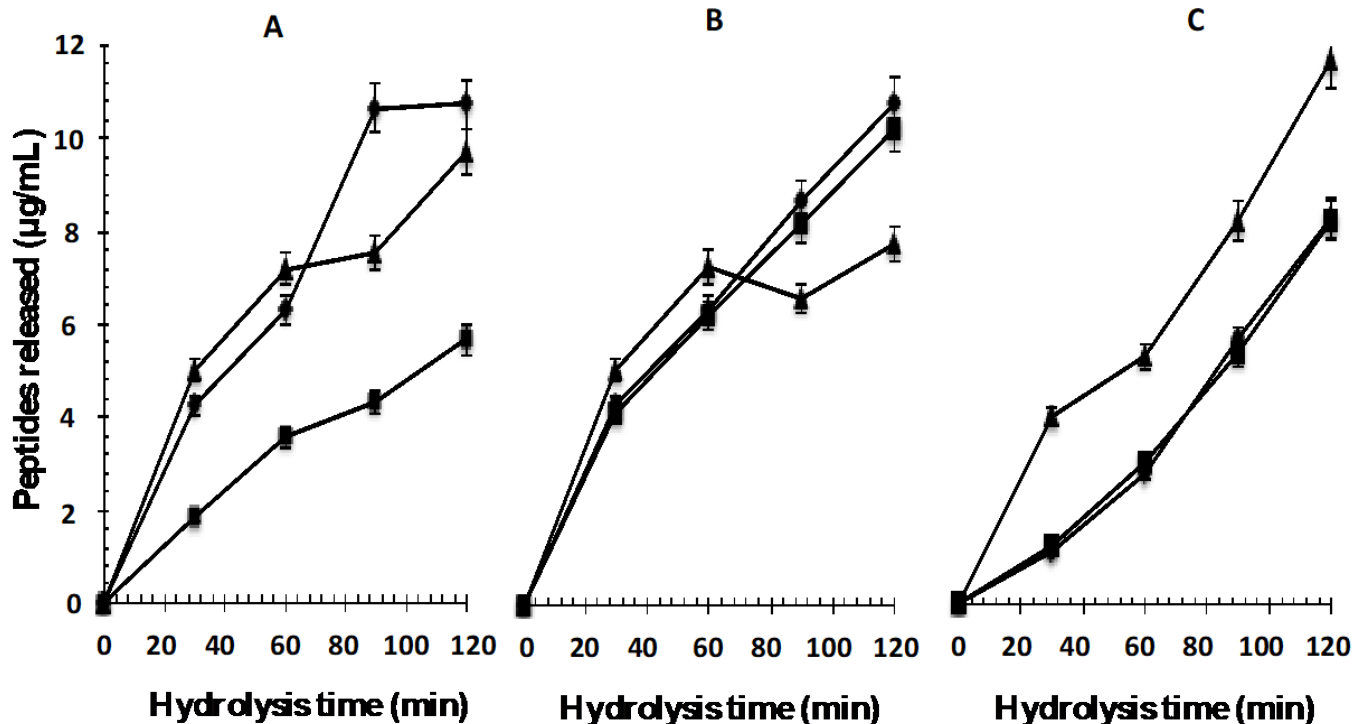


Figure 1: Peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with enzymes A: Eap1, B: chymotrypsin and C: trypsin at different units of enzyme activity (\blacktriangle 1.37 mAU/mL, \blacksquare 3.13 mAU/mL, \blacklozenge 3.71 mAU/mL) and hydrolysis time.

Figura 1: Péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo por hidrólisis enzimática empleando las enzimas A: Eap1, B: Quimotripsina y C: Tripsina a diferentes unidades de actividad enzimática (\blacktriangle 1.37 mUA/mL, \blacksquare 3.13 mUA/mL, \blacklozenge 3.71 mUA/mL) y tiempo de hidrólisis.

Eap1 and C to 3.71 mUA/mL without statistically significant differences ($p > 0.05$; R^2_{adjusted} : 0.9056) with the T enzyme to 1.37 mUA/mL to 120 min hydrolysis time. The statistical analysis showed that there are significant differences ($p < 0.05$; R^2_{adjusted} : 0.9902) between the units of enzymatic activity and the hydrolysis times evaluated. More extensive hydrolysis of WPC with these enzymes may be attributed to their broader specificities to cleave various peptide bonds. In this sense, the aspartyl protease Eap1 prefers to hydrolyze the adjacent carbon, where amino acids phenylalanine, proline, tyrosine, and leucine, while C enzyme hydrolyze the adjacent carbon of amino acids tyrosine, phenylalanine, and tryptophan, and T enzyme hydrolyze preferentially in the adjacent carbon of amino acids arginine and lysine. Likewise, the reaction time only determines the final degree of hydrolysis but the enzyme/substrate ratio directly influences the degree of hydrolysis and composition of the released peptides (Lagrange and Clark, 2018; Maa *et al.*, 2018; Kamal *et al.*, 2018; Muro-Urista *et al.*, 2011; Zakharova *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009; Erdmann *et al.*, 2008).

Determination of biological activity of released peptides

The antioxidant and antihypertensive activities of the peptides obtained from the hydrolysis were measured to determine which enzyme or combination resulted in the most substantial peptide-releasing activity. Our observations show a positive association between the release of bioactive peptides and enzyme activity units (Figure 2, 3 and 4).

Peptides with antioxidant activity released by the action of Eap1, and enzymes C and T

Figure 2 shows the antioxidant activity of peptides released at different times (0, 30, 60, 90, and 120 min). Eap1-released peptides present better antioxidant activity (1467.30 ± 23.86 mM AAEEA/100 g WCP) at an enzymatic activity of 1.37 mUA/mL in comparison with enzymes C (1164.60 ± 31.25 mM AAEEA/100 g WCP) and T (354.87 ± 7.16 mM AAEEA/100 g WCP) at the different activity levels studied. Likewise, Figure 3 shows the ferric reducing capacity of peptides released at different hydrolysis time. At an activity of 1.37 mUA/mL, Eap1-released peptides showed better ferric reducing capacity (835.20 ± 12 FeSO₄ mM/100 g WCP) in comparison with enzymes C and T at the different activity levels studied. The statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$; R^2_{adjusted} : 0.9864 and R^2_{adjusted} : 0.9824, respectively) between hydrolysis times and enzymatic activities among the different enzymes studied for both studies.

The results obtained in the present study may be due to the fact that Eap1 prefers to hydrolyze the adjacent carbon, where amino acids phenylalanine, proline, tyrosine, and leucine are found (Hedstrom, 2002), which results in the generation of peptides with antioxidant activity, since these peptides require having amino acids such as tyrosine, methionine, tryptophan, and histidine at its terminal carbon as indicated Erdmann *et al.* (2008). In this sense, The WPC used contained β -Lg and α -La that present 3.7 and 4 % of the amino acid tyrosine in their structures, respectively, which

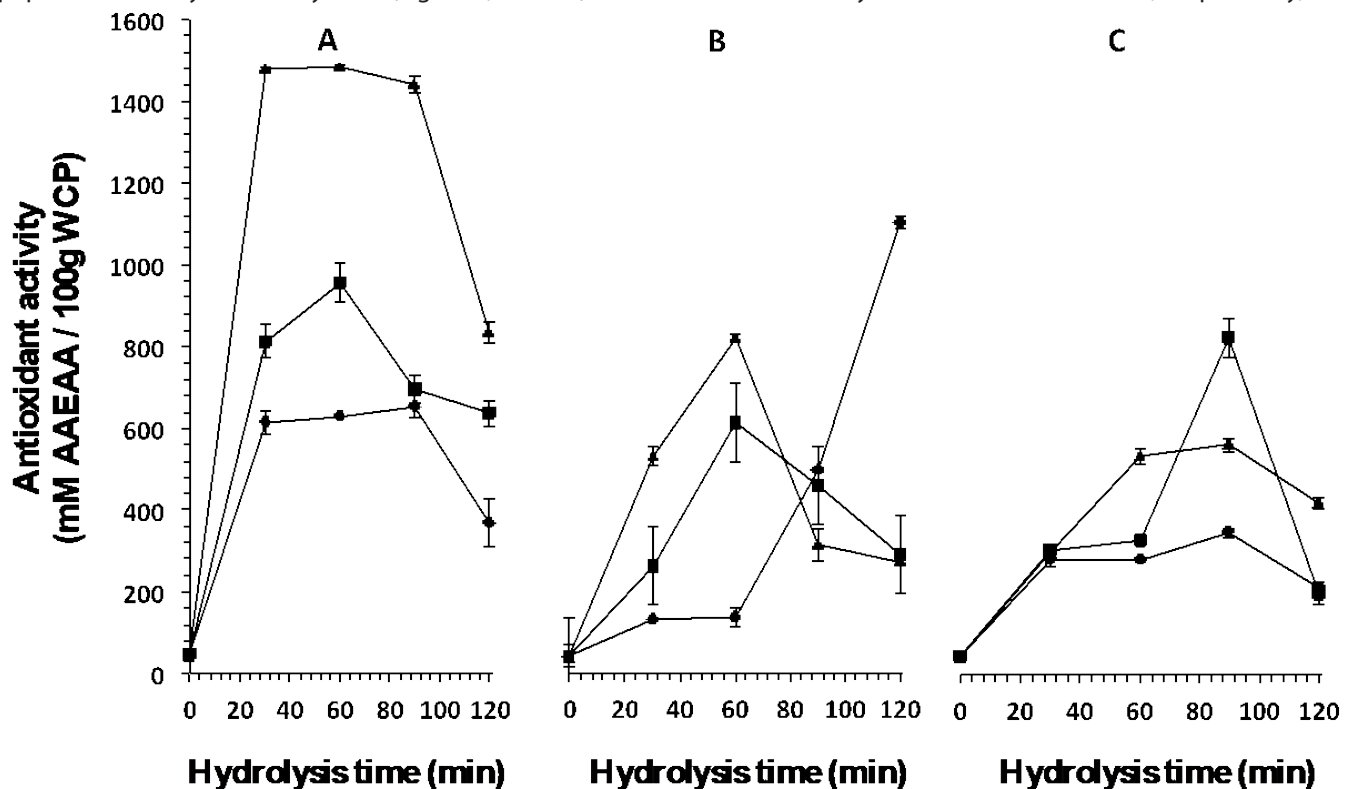


Figure 2: Antioxidant activity of peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with enzymes A: Eap1, B: chymotrypsin and C: trypsin at different units of enzyme activity (\blacktriangle 1.37 mUA/mL, \blacksquare 3.13 mUA/mL, \blacklozenge 3.71 mUA/mL) and hydrolysis time.

Figura 2: Actividad antioxidante de los péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo por hidrólisis enzimática empleando las enzimas A: Eap1, B: Quimotripsina y C: Tripsina a diferentes unidades de actividad enzimática (\blacktriangle 1.37 mUA/mL, \blacksquare 3.13 mUA/mL, \blacklozenge 3.71 mUA/mL) y tiempo de hidrólisis.

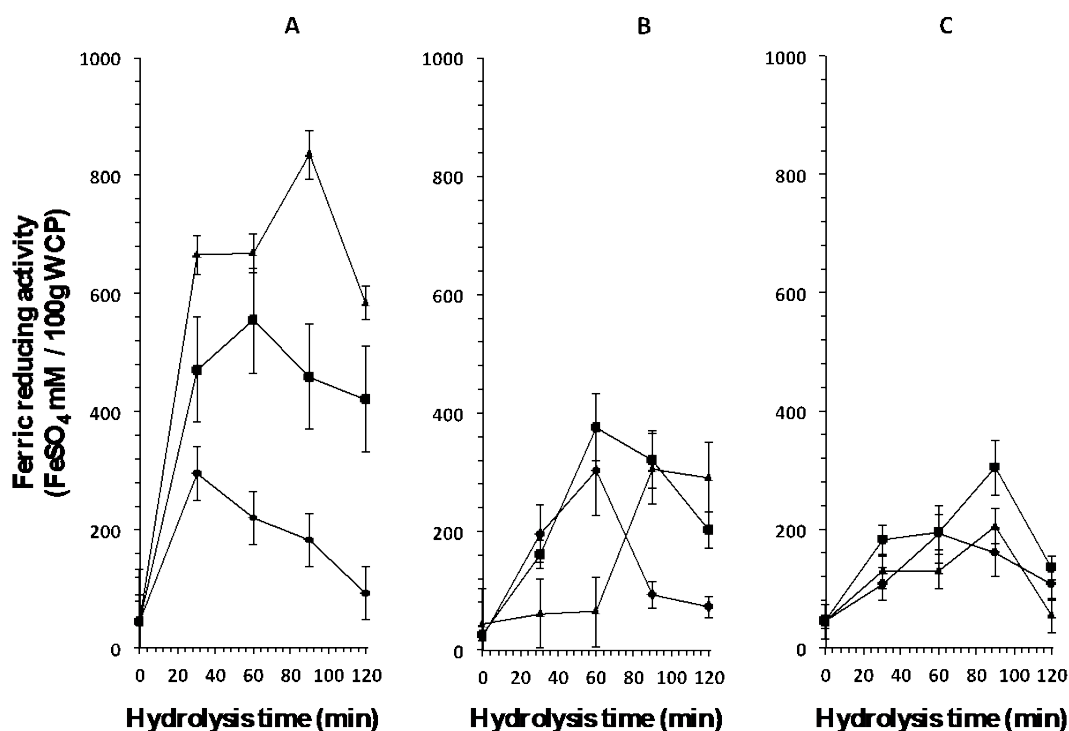


Figure 3: Ferric reducing activity of peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with enzymes A: Eap1, B: chymotrypsin and C: trypsin at different units of enzyme activity (▲ 1.37 mAU/mL, ■ 3.13 mAU/mL, ◆ 3.71 mAU/mL) and hydrolysis time.

Figura 3: Potencial reductor férrico de los péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo por medio de hidrólisis enzimática con las enzimas A: Eap1, B: quimotripsina y C: tripsina a diferentes unidades de actividad enzimática (▲ 1.37 mAU/mL, ■ 3.13 mAU/mL, ◆ 3.71 mAU/mL) y tiempo de hidrólisis.

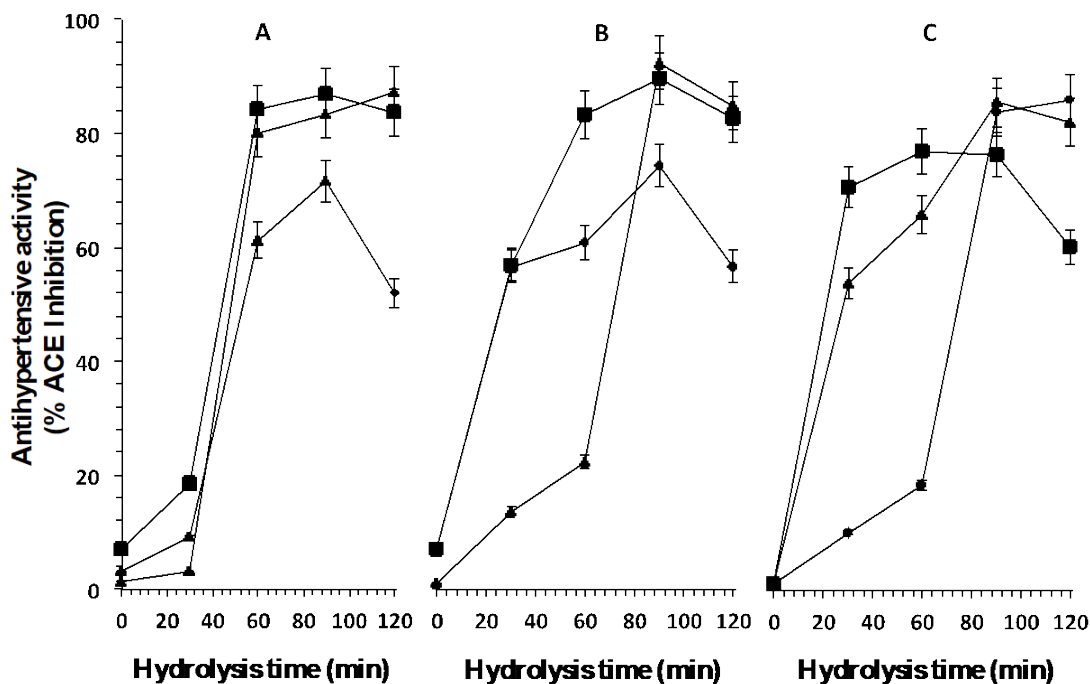


Figure 4: ACE inhibition percentage of peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with enzymes A: Eap1, B: chymotrypsin and C: trypsin at different units of enzyme activity (▲ 1.37 mAU/mL, ■ 3.13 mAU/mL, ◆ 3.71 mAU/mL) and hydrolysis time.

Figura 4: Actividad antihipertensiva de los péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo por hidrólisis enzimática empleando las enzimas A: Eap1, B: Quimotripsina y C: Tripsina a diferentes unidades de actividad enzimática (▲ 1.37 mAU/mL, ■ 3.13 mAU/mL, ◆ 3.71 mAU/mL) y tiempo de hidrólisis.

can be released by the action of Eap1. The fact that peptides presenting lower activity were obtained from hydrolysis with C could be explained because, in this case, the enzyme prefers to hydrolyze the adjacent carbon of amino acids tyrosine, phenylalanine, and tryptophan (Zakharova *et al.*, 2009), and even in the presence of amino acid tryptophan the antioxidant activity is lower than that obtained by Eap1, because the structures of β -Lg and α -La contain approximately 1 % of this amino acid, and this biological activity also depends on the amino acid sequence and the size of the released peptides (Peña-Ramos and Xiong, 2001; Erdmann *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2009; Muro-Urista *et al.*, 2011). As for the T enzyme, the low activity of the peptides obtained can be attributed to the fact that β -Lg, BSA, Lf, and Ig are constituted by lysine and arginine (30 and 6 %, 59 and 23 %, 54 and 37 %, and 82 and 84 %, respectively) (Muro-Urista *et al.*, 2011), which may indicate a higher degree of hydrolysis because enzyme T hydrolyzes preferentially in the adjacent carbon of amino acids arginine and lysine (Zakharova *et al.*, 2009) (Figure 1), and as reported by Peña-Ramos and Xiong (2001) and Peng *et al.* (2009) who indicate that the effect of the antioxidant activity depends on the composition of amino acids, the sequence, and the configuration of the peptides obtained. Moreover, results presented by Peña-Ramos and Xiong (2001) suggest that the degree of hydrolysis exerted by T on β -Lg is higher compared to the degree exerted by T on α -La, generating peptides with lower antioxidant activity. According to Bayram *et al.* (2008), antioxidant activity is inherent to β -Lg, BSA, and Lf.

Peptides with antihypertensive activity released by the action of Eap1, C and T.

Figure 4 shows antihypertensive activity (ACE inhibition percentage) and hydrolysis time. As can be observed, when WCP hydrolysis was carried out using the three enzymes, with different activity units, peptides with antihypertensive activity were released. Higher levels of biological activity and shorter reaction times were obtained in the present study in comparison with those reported by Hernández-Ledesma *et al.* (2006), who hydrolyzed β -Lg from sheep and goat whey using enzymes of animal origin (T and C) and reported that, after hydrolysis for 36 h with T, the peptides obtained from the β -Lg of ovine origin presented 74.6 % of ACE inhibition, and those obtained from β -Lg of caprine origin presented 73.9 % inhibition after hydrolysis for 24 h. The same authors reported that, when the hydrolysis of β -Lg of ovine and caprine origin is carried out using C, 73.6 % and 64.9 % of ACE inhibition are obtained, respectively, after hydrolysis for 24 h, whereas the released peptides in the present study showed an activity of 83 % of ACE inhibition after hydrolysis for 90 min with Eap1 and T. The statistical analysis showed a significant difference ($p < 0.05$, R^2_{adjusted} : 0.97) between the time of hydrolysis, enzyme and enzymatic activity evaluated.

These results can be due to the fact that β -Lg, BSA, Lf, and α -La constitute the WCP used, and this activity is inherent to these proteins (Maneva *et al.*, 2003; Prioult *et al.*, 2004). Also, as reported in the literature, peptides that show

ACE inhibitory activity possess hydrophobic residues, such as tryptophan, tyrosine, or phenylalanine, in at least one of the three C-terminal positions where they bind to the ACE active sites, blocking its activity (Aleixandre *et al.*, 2008). It has also been reported that sequences of short chain peptides carrying proline residues, in combination or not with hydrophobic residues, inhibit ACE (Hartmann and Meisel, 2007; Murakami *et al.*, 2004). Additionally, the inhibitory potency can be increased with the presence of positive charges of lysine and arginine in the C-terminal, because they represent 30% of WCP (Muro-Urista *et al.*, 2011; Hernández-Ledesma *et al.*, 2008; Dziuba *et al.*, 1999).

When analyzing the biological activity results obtained in connection with the three studied activities (1.37, 3.13, and 3.71 mUA/mL) of the evaluated enzymes (Eap1, C, and T), it was decided to use the enzymatic activity of 1.37 mUA/mL, since it presented an acceptable level of biological activity and the process requires a lower amount of enzyme, which could result in lower costs for bioactive peptide production. In this regard, studying an enzymatic cocktail would make it possible to determine whether the enzymatic activities of these three enzymes are summative and their combination results in higher biological activity in comparison with peptides obtained using individual enzymes.

Hydrolysis Kinetics of WCP with the enzymatic combination.

Four enzyme combinations, aspartyl protease-chymotrypsin (Eap1-C), aspartyl protease-trypsin (Eap1-T), trypsin-chymotrypsin (TC), and aspartyl protease-chymotrypsin-trypsin (Eap1-CT), were evaluated to determine their ability to release bioactive peptides at different times (30, 60, 90, and 120 min). Figure 5 shows that peptides released during hydrolysis of whey proteins, depends on hydrolysis time and enzyme or enzyme combinations; likewise, that the larger quantities of these peptides are released with enzyme combinations, which suggests a higher degree of hydrolysis, however, biological activity peptides also depends on the composition of amino acids, the sequence, and the configuration of the peptides obtained (Tovar-Jiménez *et al.*, 2017). The statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$; R^2_{adjusted} : 0.9593) between hydrolysis times and enzyme used.

Antioxidant activity peptides released by enzymatic combination

Figure 6 shows antioxidant activity (mM AAEEA/100g WCP) with respect to hydrolysis time. As can be observed, enzyme Eap1 (1467.30 ± 23.86 mM AAEEA/100 g WCP) and combinations C-T (994.67 ± 14.55 mM AAEEA/100 g WCP) and Eap1-C (1050.23 ± 13.99 mM AAEEA/100 g WCP) released peptides with better antioxidant activity; with no significant differences observed. However, Eap1 released the antioxidant peptides in a shorter time than the combinations. Figure 7 shows the ferric reducing capacity of peptides released at different hydrolysis time, Eap1-released

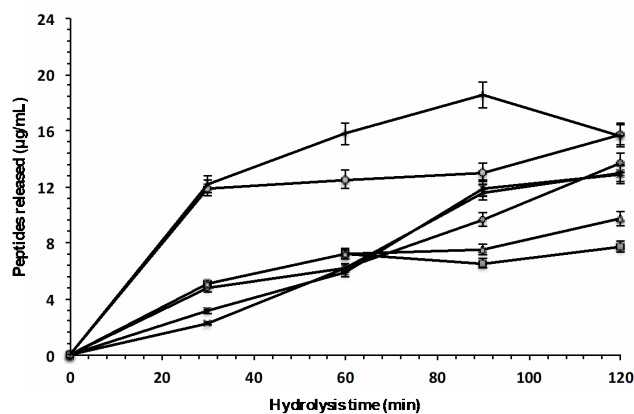


Figure 5: Peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with individual enzymes (◆ Eap1, ■ chymotrypsin and ▲ trypsin) and with enzymatic cocktail (× Chymotrypsin-Eap1, * Trypsin-Eap1, ● Chymotrypsin-Trypsin and | Chymotrypsin-Eap1-Trypsin).
Figura 5: Péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo empleando las enzimas individuales (◆ Eap1, ■ Quimotripsina ▲ Tripsina) y las combinaciones enzimáticas (× Quimotripsina-Eap1, * Tripsina-Eap1, ● Quimotripsina-Tripsina y | Quimotripsina-Eap1-Tripsina).

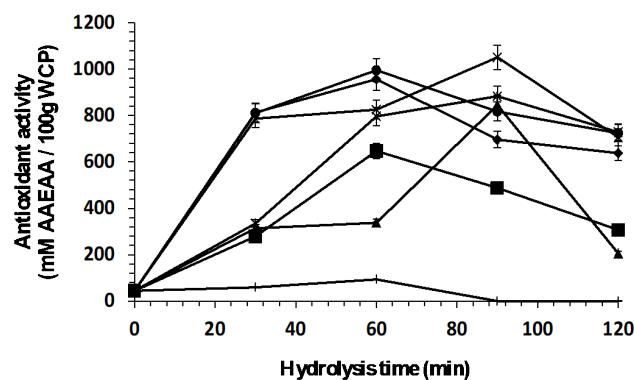


Figure 6: Antioxidant activity of peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with individual enzymes (◆ Eap1, ■ chymotrypsin and ▲ trypsin) and with enzymatic cocktail (× Chymotrypsin-Eap1, * Trypsin-Eap1, ● Chymotrypsin-Trypsin and | Chymotrypsin-Eap1-Trypsin).
Figura 6: Actividad antioxidante de los péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo empleando las enzimas individuales (◆ Eap1, ■ Quimotripsina ▲ Tripsina) y las combinaciones enzimáticas (× Quimotripsina-Eap1, * Tripsina-Eap1, ● Quimotripsina-Tripsina y | Quimotripsina-Eap1-Tripsina).

peptides present better ferric reducing capacity ($835.20 \pm 12 \text{ FeSO}_4 \text{ mM}/100\text{g WCP}$) in comparison with enzymes C ($305.35 \pm 7.1 \text{ FeSO}_4 \text{ mM}/100\text{g WCP}$) and T ($205.82 \pm 3.2 \text{ FeSO}_4 \text{ mM}/100 \text{ WCP}$) and enzymatic combinations (Chymotrypsin-Eap1 [$399.09 \pm 5.3 \text{ FeSO}_4 \text{ mM}/100\text{g WCP}$], Trypsin-Eap1 [$220.63 \pm 2.8 \text{ FeSO}_4 \text{ mM}/100\text{g WCP}$], Chymotrypsin-Trypsin and Chymotrypsin-Eap1-Trypsin [$23.3 \pm 1.5 \text{ FeSO}_4 \text{ mM}/100\text{g WCP}$]). The statistical analysis showed significant differences ($p < 0.05$, $R^2_{\text{adjusted}}: 0.9307$; $R^2_{\text{adjusted}}: 0.9543$) in hydrolysis times depending on the enzymatic mixture.

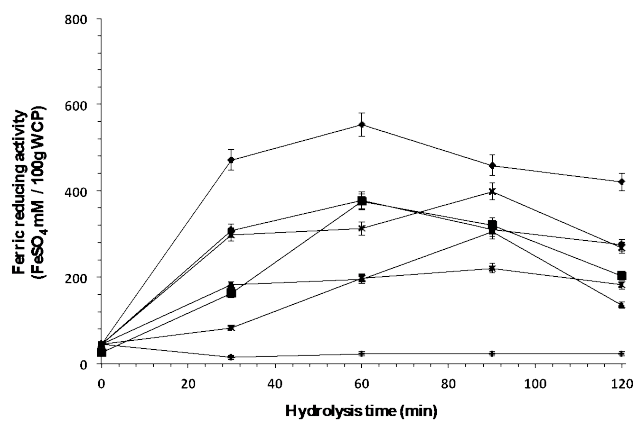


Figure 7: Ferric reducing activity of peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with individual enzymes (◆ Eap1, ■ chymotrypsin and ▲ trypsin) and with enzymatic cocktail (× Chymotrypsin-Eap1, * Trypsin-Eap1, ● Chymotrypsin-Trypsin and | Chymotrypsin-Eap1-Trypsin).
Figura 7: Potencial reductor férrico de los péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo por medio de hidrólisis enzimática con las enzimas individuales (◆ Eap1, ■ quimotripsina y ▲ tripsina) y con el cóctel enzimático (× Quimotripsina-Eap1, * Tripsina-Eap1, ● Quimotripsina-Tripsina y | Quimotripsina-Eap1-Tripsina).

Antihypertensive activity peptides released by the action of the enzymatic combination

Figure 8 shows the percentage inhibition of ACE with respect to hydrolysis time. The enzymatic combination releases peptides with better antihypertensive activity after hydrolysis for 120 min (96 % ACE inhibition). Similarly, the peptides obtained with enzymes Eap1, C, and the enzymatic combination Eap1-C presented no significant differences; however, Eap1 released these peptides in less time. The statistical analysis revealed that hydrolysis time depends on the enzymatic combination used ($p < 0.05$, $R^2_{\text{adjusted}}: 0.9991$).

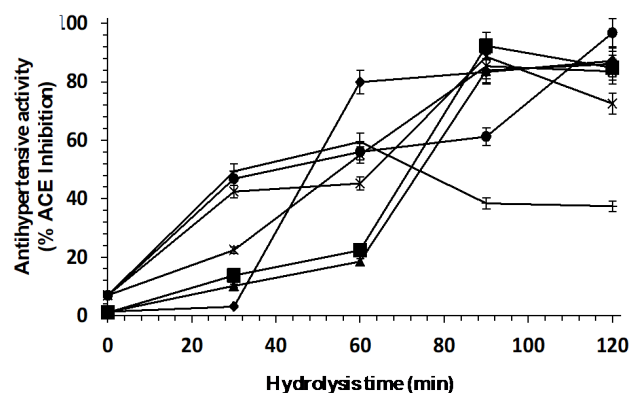


Figure 8: ACE inhibition percentage of peptides released from the whey protein concentrate by enzymatic hydrolysis with individual enzymes (◆ Eap1, ■ chymotrypsin and ▲ trypsin) and with enzymatic cocktail (× Chymotrypsin-Eap1, * Trypsin-Eap1, ● Chymotrypsin-Trypsin and | Chymotrypsin-Eap1-Trypsin).
Figura 8: Actividad antihipertensiva de los péptidos liberados del concentrado proteico del suero lácteo empleando las enzimas individuales (◆ Eap1, ■ Quimotripsina ▲ Tripsina) y las combinaciones enzimáticas (× Quimotripsina-Eap1, * Tripsina-Eap1, ● Quimotripsina-Tripsina y | Quimotripsina-Eap1-Tripsina).

The peptides obtained with the different enzymatic combinations, suggest their possible uses in the elaboration of protein hydrolysates for applications requiring higher degrees of protein hydrolysis, than what is possible using individual enzymes (Figure 5). This experimental evidence can be interpreted starting from the fact that proteolytic enzymes act only on peptide bonds containing certain amino acids, for this reason, more substantial hydrolysis is obtained when using enzyme mixtures to maximize hydrolytic action. Our results differ from those reported by Ubalde and Cantera (2002), who used a mixture of *Bacillus subtilis* protease and obtain whey hydrolysates presenting a low degree of hydrolysis; however, the authors failed to determine the biological activity of such hydrolysates. Nevertheless, the results of our study coincide with those reported by Morris-Quevedo *et al.* (2001), who evaluated the effect of the use of five enzymatic combinations (bromelain-trypsin, bromelain-pancreatin, papain-bromelain, papain-trypsin, and pancreatin-papain) in obtaining protein hydrolysates from the biomass of the microalgae *Chlorella vulgaris* previously treated with ethanol; the best results were obtained with the papain-trypsin and papain-pancreatin mixtures. They also state that the use of enzymatic mixtures has a positive effect on the production of hydrolysates presenting a high degree of hydrolysis in comparison with individual enzymes, as shown by the comparison of their hydrolytic actions.

In general, the antioxidant and antihypertensive biological activity results obtained by the hydrolysis of milk serum proteins using individual enzymes (Eap1, C, and T) and enzymatic combinations (Eap1-C, Eap1-T, T-C, and C- Eap1-T) show that the best results are obtained when using Eap1 enzyme individually.

CONCLUSIONS

The aspartyl protease obtained from *S. reilianum* (Eap1) allows for the obtention of peptides with better antioxidant activity and similar antihypertensive activity in comparison with those obtained using commercial enzymes trypsin and chymotrypsin at 1.37 mUA/mL under these study conditions.

The peptides obtained using the enzymatic combinations evaluated suggest that their hydrolysates present a higher degree of hydrolysis in comparison with those of individual enzymes.

These findings are interesting because obtaining active peptides by hydrolysis using proteases of fungal origin offers an important biotechnological alternative for the use of an agroindustrial by-product like whey, since Eap1 allows obtention bioactive peptides in less time and with less enzymatic quantity.

REFERENCES

- Aleixandre, A., Miguel, M. and Muguerza, B. (2008). Péptidos hipertensivos derivados de proteínas de leche y huevo. *Nutrición Hospitalaria* 23, 313-318.
- Atacan, K., Cakiroglu, B. and Ozacar, M. (2016). Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine serum albumin and its application in the bovine milk. *Food Chemistry* 212, 460-468. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.011>
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez, A. and Bouza, J.J. (2001). Bioactive milk peptides and proteins. *ARS Pharmaceutica* 42,135-145.
- Bayram, T., Pekmez, M., Arda, N. and Yalcin, A. (2008). Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta* 75, 705-9. doi: 10.1016/j.talanta.2007.12.007. Epub 2007 Dec 23.
- Clare, D.A. and Swaisgood, H.E. (2000). Bioactive Milk Peptides: A prospectus. *Journal of Dairy Science* 83, 1187-1195. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(00)74983-6
- Dziuba, J., Minkiewicz, P., Nalecz, D. and Iwaniak, A. (1999). Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung-Food* 43, 190-195. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3803(19990601)43:3<190::AID-FOOD190>3.0.CO;2-A
- Erdmann, K., Cheung, B. and Schroder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19, 643-54. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2007.11.010
- Figuroa-Hernández, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., García-Garibay, M. and Jiménez-Guzmán J. (2012). Producción de péptidos fijadores de calcio y hierro por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NCFB 712. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11, 259-267.
- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M.R., Matarante, A., Considine, T., Cagno, R., Guinee, T. and Fox, P.F. (2002). Microbiological, compositional, biochemical and textural characteristics of *Caciocavallo Pugliese* cheese during ripening. *International Dairy Journal* 12, 511-523. DOI: 10.1016/S0958-6946(02)00042-0
- Hartmann, R. and Meisel, H. (2007). Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Current Opinion in Biotechnology* 18, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.01.013>
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews* 102, 4501-4523. <https://doi.org/10.1021/cr000033x>
- Hernández-Ledesma, B., Recio, I. and Amigo, L. (2008). β-Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino acids*. 35(2): 257-265. DOI: 10.1007/s00726-007-0585-1
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I. and Amigo, L. (2006). Effect of β-lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of Chromatography A* 1116, 31-37. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.006
- Kamal, H., Jafar, S., Mudgil, P., Murali, C., Amin, A., Maqsood, S. (2018). Inhibitory properties of camel whey protein hydrolysates toward liver cancer cells, dipeptidyl peptidase-IV, and inflammation. *Journal of Dairy Science* 101, 1-10. doi: 10.3168/jds.2018-14586
- Lagrange, V. and Clark, D.C. (2018). Nutritive and Therapeutic Aspects of Whey Proteins. En: *Whey Proteins*, pp. 549-577. Elsevier Inc.
- Luo, J., Li, L. and Kong, L. (2012). Preparative separation of phenylpropanoid glycerides from the bulbs of *Lilium lancifolium* by high-speed counter-current chromatography and evaluation of their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 131:1056-1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.112>

- Mandujano-González, V., Arana-Cuenca, A., Anducho-Reyes, M.A., Téllez-Jurado, A., González-Becerra, A.E. and Mercado-Flores, Y. (2013). Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. *Protein Expression and Purification* 92, 214-222. doi: 10.1016/j.pep.2013.10.003
- Maneva, A., Taleva, B. and Maneva, L. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design* 9, 1289-1295. DOI: 10.2174/1381612033454847
- Maoa, Y., Krischkea, M., Hengsta, C., Kulozika, U. (2018). Comparison of the influence of pH on the selectivity of free and immobilized trypsin for β -lactoglobulin hydrolysis. *Food Chemistry* 253, 194-202. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.151>
- Mendoza-Jiménez, Y.L., Eusebio-Moreno, J.C., Álvarez-García, R., Abreu-Corona, A., Vargas-Hernández, G., Téllez-Jurado, A., Tovar-Jiménez, X. (2018). Actividad antioxidante de los hidrolizados proteicos del frijol común (*Phaseolus vulgaris*) cv Negro primavera-28 y Flor de Durazno. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. 2, 25-30.
- Mensink, R.P. (2006). Dairy products and the risk to develop type 2 diabetes or cardiovascular disease. *International Dairy Journal* 16, 1001-1004. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.013>
- Morris-Quevedo, H.J., Almares-Asceo, A., Carrillo-Farnés, O., Abdala-Díaz, R.T. (2001). Combinaciones enzimáticas en la obtención de hidrolizados proteicos a partir de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana Alimentaria Nutrición* 15, 85-89.
- Murakami, M., Tonouchi, H., Takahashi, R., Kitazawa, H., Kawai, Y. and Negishi, H. (2004). Structural analysis of a new anti-hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *Journal of Dairy Science* 87, 1967-1974. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)70013-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)70013-2)
- Muro-Urista, C., Álvarez-Fernández, R., Riera-Rodríguez, F., Arana-Cuenca, A. and Téllez-Jurado, A. (2011). Production and functionality of active peptides from milk. Review. *Food Science and Technology International* 1, 293-317. doi: 10.1177/1082013211398801.
- Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Okubo, A., Yamazaki, S. and Takano, T. (1995). Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. *Journal of Dairy Science* 78, 777-783. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76689-9
- Peng, X., Xiong, Y. and Kong, B. (2009). Antioxidant activity of peptide fractions from whey protein hydrolysates as measured by electron spin resonance. *Food Chemistry* 113, 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.068>
- Peña-Ramos, E. and Xiong, Y. (2001). Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of Dairy Science* 84, 2577-83. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74711-X
- Pfeuffer, M. and Schrezenmeir, J. (2006). Milk and the metabolic syndrome. *Obesity Reviews* 8, 109-118. DOI: 10.1111/j.1467-789X.2006.00265.x
- Prioult, G., Pecquet, S. and Fliss, I. (2004). Stimulation of interleukin-10 production by acidic beta-lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 266-71. DOI: 10.1128/CDLI.11.2.266-271.2004.
- Rocha, C., Gonçalves, M.P., Teixeira, J.A. (2011). Immobilization of trypsin on spent grains for whey protein hydrolysis. *Process Biochemistry* 46, 505-511. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.001>
- Thomä-Worringer, C., Sorensen, J. and López-Fandiño, R. (2006). Health effects and technological features of caseinomaclopeptide. *International Dairy Journal* 16, 1324-33. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.06.012>
- Tovar-Jiménez, X., Arana-Cuenca, A., Téllez-Jurado, A., Abreu-Corona, A. and Muro-Urista, C. (2012). Traditional Methods for Whey Protein Isolation and Concentration: Effects on Nutritional Properties and Biological Activity. *Journal Mexican Chemistry Society* 56, 369-377. <https://doi.org/10.29356/jmcs.v56i4.246>
- Tovar-Jiménez, X., Muro-Urista, C., Téllez-Jurado, A., Abreu-Corona, A. and Arana-Cuenca, A. (2017). Hydrolysate antimicrobial activity released from bovine whey protein concentrate by the aspartyl protease eap1 of *Sporisorium reilianum*. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 16, 11-18.
- Ubalde, M.C. and Cantera, A.M.B. (2002). Utilización de una mezcla de proteasas para la obtención de hidrolizados de bajo grado de hidrólisis. *Información Tecnológica* 13, 77-84.
- Zakharova, E., Horvath, M.P. and Goldenberg, D.P. (2009). Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 11034-11039. DOI: 10.1073/pnas.0902463106